



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación del proceso inflamatorio de la
toxoplasmosis aguda, crónica y reactivada en modelo
murino por métodos inmunohistoquímicos**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga

Parasitóloga

AUTOR

Eleonora CORDOVA GONZALES

ASESOR

Dr. Juan Atilio JIMENEZ CHUNGA

Lima, Perú

2019

*Para mi papá, que fue el primer científico que conocí y el primer amigo que
tuve, gracias por todo el cariño que me diste y por haberme animado a estudiar
esta hermosa carrera.*

Para mi mamá y mi hermana, que siguen llenando de amor y alegría mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo, comprensión y cariño, que me han guiado y me han hecho querer ser mejor persona. Este y cada uno de mis logros es de ustedes.

Al Dr. Juan Jiménez Chunga, por ser un excelente mentor. Su dedicación, constancia y paciencia me han servido como ejemplo tanto para el desarrollo de esta tesis como para mi futuro profesional. Gracias, profe.

A la Dra. Maritza Calderón, Renzo Gutiérrez y al Grupo de Investigación de *Toxoplasma* de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por abrirme sus puertas y permitirme conocer más a fondo el mundo de la investigación científica. Sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A Eliza, Fabiola, Juan, Adrián y Diego, por brindarme incondicionalmente su amistad, ustedes han hecho que disfrute más mi paso por la universidad. Gracias por las risas, los consejos y los abrazos de consuelo, significan mucho para mí.

A Gabriel, Raúl y Cristina, porque sin ustedes el trabajo en el laboratorio hubiera sido menos divertido. Gracias por su ayuda y por sus palabras, que me animaron a esforzarme más.

A Vania, Allison, Daisy, Katy y Carmen, por ser amigas con las que siempre puedo contar. Gracias por estar a mi lado aún después de tantos años, me siento muy afortunada de haberlas conocido.

A Miguel y Franklin, por su apoyo en el desarrollo de la tesis y por enseñarme la importancia del trabajo en equipo.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por la subvención de la presente tesis, código B17100424a.

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito zoonótico de amplia distribución geográfica, y es causante de cuadros clínicos severos en humanos. Es importante conocer la patología cerebral en la toxoplasmosis, en particular la inflamación producida debido a las graves secuelas observadas en personas inmunosuprimidas y a los potenciales efectos neurológicos en personas con infección aguda o crónica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las diferencias de los procesos inflamatorios de la toxoplasmosis aguda, crónica y reactivada utilizando un modelo murino con toxoplasmosis cerebral.

Se infectaron ratones *Swiss-Webster* con la cepa Me49 de *T. gondii* por vía oral, por un tiempo de 18 días (fase aguda), 120 días (fase crónica) y 165 días con un tratamiento inmunosupresor utilizando ciclofosfamida para inducir la reactivación de la infección. Para evaluar la eficacia del esquema de inmunosupresión, se evaluó su efecto en la competencia inmunológica, donde se evidenció una disminución significativa del número total de leucocitos ($p=0.043$) y un descenso en la producción de anticuerpos anti-*T. gondii* en los ratones inmunosuprimidos. Por otro lado, el análisis histológico reveló que tanto los ratones en fase aguda como los de fase crónica presentaron una mayor frecuencia de lesiones inflamatorias y un mayor ratio de microglia activada, a diferencia de los ratones inmunosuprimidos que mostraron resultados opuestos.

Los resultados sugieren que la carga parasitaria varía de acuerdo al tiempo de infección y estado inmune del hospedero, siendo este último un factor importante para el desarrollo de una fuerte respuesta inflamatoria con una alta participación microglial.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis cerebral, microglia, inflamación, modelo murino.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a wide-distributed zoonotic parasite that causes severe clinical manifestations in humans. It is important to learn the cerebral pathology in toxoplasmosis, particularly the inflammation that is produced as it causes serious sequelae in immunocompromised people and potential neurological illness in people with acute or chronic infection. The main objective of the present research project was to assess the differences in the inflammatory process in acute, chronic and reactivated toxoplasmosis by using a murine model of cerebral toxoplasmosis.

Swiss-Webster mice were infected with *T. gondii* by oral route, with an infection period of 18 days (acute phase), 120 days (chronic phase) and 165 days with an immunosuppressive treatment to induce the reactivation of the infection. To assess the efficiency of the immunosuppressive treatment, its effect on immunological competence was observed. In immunosuppressed mice, a significant decrease in total leukocyte number ($p=0.043$) and a lower antibody production against *T. gondii* were revealed. On the other hand, histological analysis showed that acute and chronic mice presented inflammatory lesions with greater frequency and also a higher rate of activated microglia, as opposed to immunosuppressed mice.

These results suggest that the parasite burden varies in relation to infection time and immune status of the host, the last also being an important factor for the development of a strong inflammatory response with a high microglial involvement.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, cerebral toxoplasmosis, microglia, inflammation, murine model.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Biología de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
2.1.1 Ciclo de vida	4
2.1.2 Cepas de <i>T. gondii</i>	6
2.2 Toxoplasmosis	8
2.2.1 Epidemiología	8
2.2.2 Cuadros clínicos	10
2.2.3 Diagnóstico	12
2.3 Toxoplasmosis en el SNC.....	13
2.3.1 Histopatología	13
2.3.2 Tropismo de <i>T. gondii</i> en el cerebro.....	16
2.3.3 Respuesta inmune a <i>T. gondii</i> en el cerebro	18
III. HIPÓTESIS.....	20
IV. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
V. MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1 Cepa de <i>Toxoplasma gondii</i>	22
5.2 Diseño experimental	22
5.3 Determinación del efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida.....	24
5.3.1 Inmunosupresión	24
5.3.2 Toma de muestra.....	24
5.3.3 Conteo total de leucocitos	24
5.3.4 Cinética de anticuerpos IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i>	25
5.4 Determinación de carga parasitaria e histopatología.....	26

5.4.1	Procesamiento histológico.....	26
5.4.2	Coloración Hematoxilina – Eosina (HE)	26
5.4.3	Análisis de carga parasitaria cerebral	27
5.5	Determinación de la activación de la microglia	27
5.5.1	Pruebas de inmunohistoquímica	27
5.5.2	Determinación de la presencia de microglia activada	29
5.6	Análisis estadístico.....	29
VI.	RESULTADOS	30
6.1	Efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida.....	30
6.2	Análisis de carga parasitaria, distribución de quistes y patología	32
6.3	Evaluación de la activación de la microglia	36
VII.	DISCUSIÓN.....	40
7.1	La ciclofosfamida como agente inmunosupresor	40
7.2	Carga parasitaria e histopatología de la infección por <i>T. gondii</i>	41
7.3	Microglia activada en la patología de la toxoplasmosis cerebral	45
VIII.	CONCLUSIONES.....	47
IX.	RECOMENDACIONES	48
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
XI.	ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Efecto de la inmunosupresión en el conteo total de leucocitos	30
Tabla 2. Cantidad media de quistes en cerebelo de ratones infectados	32
Tabla 3. Cantidad media de quistes en cerebro de ratones infectados.....	33
Tabla 4. Ratio de microglia activada en ratones infectados.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estadíos de <i>T. gondii</i>	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	5
Figura 3. Diseño experimental de los grupos de trabajo en ratones.	23
Figura 4. Niveles de anticuerpos anti- <i>T. gondii</i> en ratones del grupo C.....	31
Figura 5. Resultados histopatológicos en los grupos de infección	34
Figura 6. Diversas formas de inflamación observadas en los grupos de infección	35
Figura 7. Morfología de la microglia y regiones analizadas del hipocampo	36
Figura 8. Pruebas de inmunohistoquímica para Iba-1 en ratones agudos y crónicos .	38
Figura 9. Pruebas de inmunohistoquímica para Iba-1 en ratones control y ratones inmunosuprimidos.....	39

I. INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un protozoo perteneciente al *phylum* Apicomplexa que produce una enfermedad zoonótica de importancia en salud pública y veterinaria debido a que puede infectar a una gran variedad especies de sangre caliente (Weiss y Dubey, 2009). La toxoplasmosis es una de las enfermedades parasitarias más comunes en humanos y se ha estimado que un tercio de la población ha sido expuesta al parásito (Tenter *et al.*, 2000).

En humanos, la toxoplasmosis puede presentar varios cuadros clínicos que son el resultado tanto del genotipo del parásito como de factores intrínsecos del hospedero, como su estado inmunológico. Debido al tropismo del parásito hacia el sistema nervioso central, es común el registro de casos de toxoplasmosis con compromiso cerebral. De esta manera, en personas inmunocompetentes con toxoplasmosis adquirida se ha observado cuadros de encefalitis difusa o local y meningoencefalitis (Ho-Yen, 2001); además, en los últimos años se ha relacionado la infección crónica de *T. gondii* con una serie de trastornos neurológicos, como esquizofrenia, depresión, entre otros, lo que indicaría un efecto directo o indirecto del parásito en el funcionamiento normal cerebral (Yolken y Torrey, 2008; Henriquez *et al.*, 2009; Yolken *et al.*, 2009; Flegr, 2013). Por otro lado, en personas inmunosuprimidas se presenta un cuadro de encefalitis toxoplásmica, que puede llegar a ser mortal y está caracterizada por una inflamación intensa, focos de necrosis y una activa proliferación parasitaria en el parénquima cerebral (Chirch y Luft, 2007).

Para el estudio de estas manifestaciones clínicas se han utilizado modelos animales, los cuales han contribuido al conocimiento de algunos mecanismos de infección, la patología y la respuesta inmune que ocurre en la toxoplasmosis cerebral, siendo el ratón el modelo más utilizado (Lüder *et al.*, 2014). De esta manera, varios trabajos han

descrito la presencia de infiltraciones celulares, nódulos de inflamación y necrosis (Conley *et al.*, 1981a; Kittas *et al.*, 1984; Ferguson *et al.*, 1991), destacándose como importante secuela la presencia de lesiones inflamatorias. La mayoría de estos trabajos se ha enfocado en el estudio de solo alguna de las fases de la toxoplasmosis, dejando interrogantes, como el progreso de la infección y las diferencias en la respuesta inmune durante las distintas fases de la infección. Por esta razón, conocer la evolución de dichas lesiones y los factores involucrados es de importancia para esclarecer el curso que sigue *T. gondii* una vez que se asienta en el cerebro y también podría contribuir a la selección de futuros blancos terapéuticos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Biología de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux, es un parásito intracelular que pertenece al *phylum* Apicomplexa y es la única especie del género *Toxoplasma* (Tenter *et al.*, 2000). Debido a la gran cantidad de hospederos intermediarios a los que puede infectar, es considerado como uno de los parásitos de animales más importantes (Hill *et al.*, 2005). Cuenta con tres estadios infectivos: el esporozoito, el taquizoito y el bradizoito.

- El esporozoito se encuentra dentro del ooquiste, que es una estructura ovoide de aproximadamente 10 x 12 μm y es el resultado de la reproducción sexual del parásito en el hospedero definitivo y que una vez maduro contiene dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoitos (Wong y Remington, 1993; Tenter *et al.*, 2000) (Figura 1D).
- El taquizoito es la forma asexual invasiva de rápida multiplicación. Tiene forma de media luna y mide aproximadamente 7 x 3 μm . Se multiplica por un proceso llamado endodiogenia y puede infectar virtualmente a cualquier célula nucleada, ya sea fagocítica o no (Wong y Remington, 1993; Dubey, 2014) (Figura 1A).
- El bradizoito es otra forma asexual cuya replicación es lenta. Los bradizoitos se encuentran dentro de quistes tisulares y son indicadores de la fase crónica de la infección. Tienen un marcado tropismo por el tejido muscular y cerebral, aunque también pueden ser encontrados en otros órganos, donde pueden permanecer de

por vida en el hospedero (Wong y Remington, 1993; Tenter *et al.*, 2000) (Figura 1B,C).

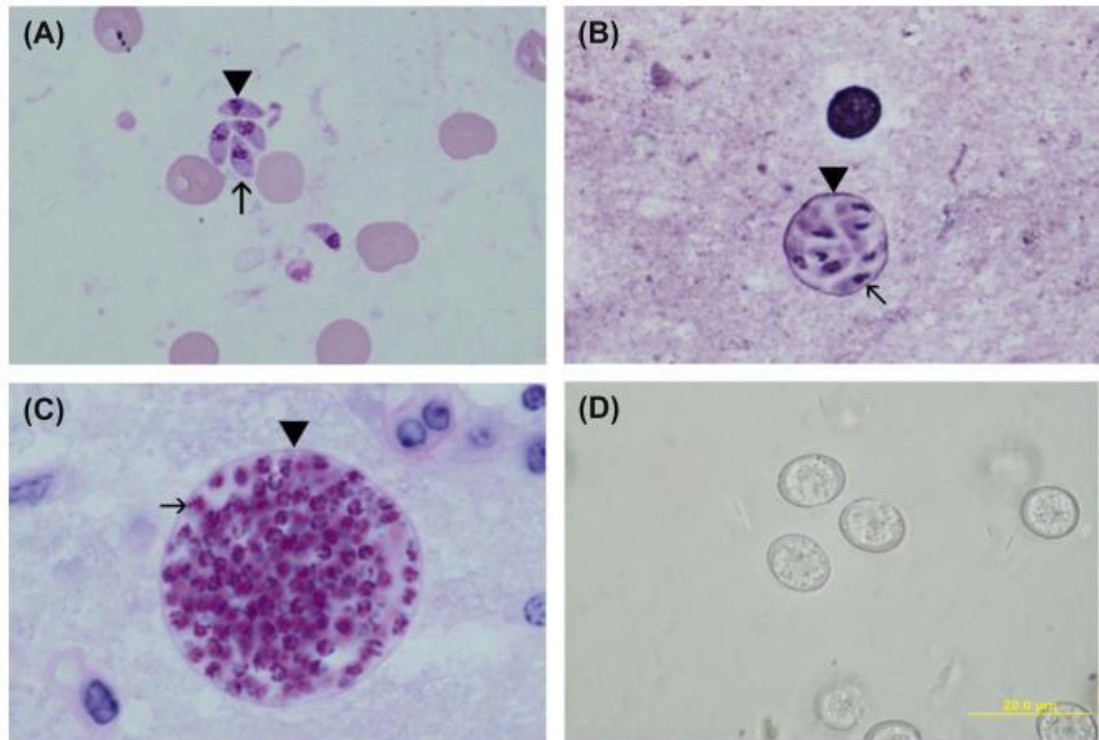


Figura 1. Estadíos de *T. gondii*. (a) Taquizoitos en frotis sanguíneo. (b) y (c) Quistes tisulares conteniendo bradizoitos. (d) Ooquistes no esporulados en heces de gato (Dubey, 2014).

2.1.1 Ciclo de vida

Toxoplasma gondii posee un ciclo heteroxeno en el cual el hospedero definitivo es un animal perteneciente a la familia *Felidae* y los hospederos intermediarios pueden ser diferentes especies de aves y mamíferos, incluyendo al hombre. Consiste en una fase sexual, llevada a cabo en el intestino del hospedero definitivo y que termina con la producción de ooquistes; y una fase asexual, que implica tanto el desarrollo y multiplicación de taquizoitos como la formación de quistes tisulares en los hospederos intermediarios (Tenter *et al.*, 2000).

Los ooquistes maduros, los taquizoitos y los quistes tisulares son infectivos tanto para los hospederos definitivos como para los intermediarios, en los que la

transmisión se puede dar de manera horizontal por el consumo de quistes tisulares en carnes insuficientemente cocidas, por ooquistes en agua o alimentos contaminados. De manera vertical, ocurre por la transmisión de taquizoitos a través de la placenta. Por esta razón, la infección se puede realizar por las dos formas entre los hospederos definitivos e intermediarios, como explica Tenter *et al.* (2000) al mencionar que “la infección se puede dar entre hospederos intermediarios, entre hospederos definitivos o entre hospederos intermediarios y definitivos”.

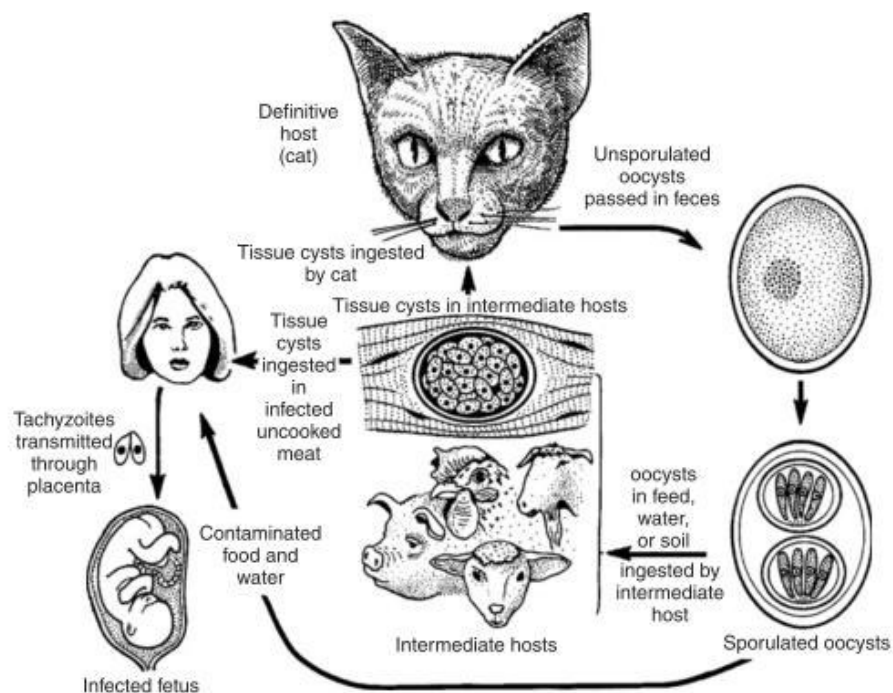


Figura 2. Ciclo de vida de *T. gondii* (Dubey, 2014).

2.1.2 Cepas de *T. gondii*

En la genotipificación de *T. gondii* se han utilizado diversas técnicas, en su mayoría moleculares, para detectar la variación intraespecífica del parásito. Clásicamente, se divide a *T. gondii* en tres linajes, llamados tipo I, tipo II y tipo III, que corresponden a poblaciones clonales distintas y difieren solo en 1 – 2% a nivel nucleotídico (Dardé *et al.*, 2014; Sibley *et al.*, 2009).

A pesar de la similitud genética, los tres linajes tienen características diferentes en cuanto a la capacidad de migración y de crecimiento (Sibley *et al.*, 2009), sin embargo, la mayor diferencia es la respuesta que causa la infección en un modelo murino. De esta manera, las cepas del tipo I son altamente virulentas en ratones, produciendo altas tasas de mortalidad con dosis bajas de infección (dosis letal (LD_{100}) de aproximadamente 1 organismo); por otro lado, las cepas de los tipos II y III tienen una virulencia intermedia y baja, respectivamente, y una dosis letal media mayor ($LD_{50} \geq 10^5$ organismos) (Sibley *et al.*, 2009; Szabo y Finney, 2017). También se han encontrado cepas de *T. gondii* que muestran una mezcla entre dos genotipos, llamadas cepas recombinantes, u otras que son muy divergentes de los linajes establecidos, denominadas cepas exóticas o atípicas (Howe y Sibley, 1995; Sibley *et al.*, 2009).

La distribución de cada linaje varía según la región geográfica, siendo el tipo II el que más predomina en Europa y América del Norte, tanto en humanos como en animales. Sin embargo, hay reportes de presencia del tipo III en Alemania y zonas del sur de Europa, siendo más raramente hallado el tipo I (Dardé *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2005a; Dubey *et al.*, 2006a). Lo mismo fue observado en América del Norte, aunque hay una mayor variedad de cepas en esta región con respecto a Europa (Dubey *et al.*, 2003a; Dardé *et al.*, 2014).

En América Central y del Sur se ha observado que la diversidad genética de cepas de *T. gondii* es mayor a la de otras regiones, encontrándose genotipos

distintos (Pena *et al.*, 2008; Dardé *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2007). Además, la predominancia de cada linaje también varía, reportándose la presencia tanto del tipo I como del III y estando ausente el tipo II en la gran mayoría de países (Dubey *et al.*, 2003b; Dubey *et al.*, 2003c; Dubey *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2005b; Dubey *et al.*, 2005c); también se ha reportado la presencia también de cepas recombinantes (Dubey *et al.*, 2006b). Una excepción importante es Chile, donde se ha encontrado predominancia de los tipos II y III; dicha diferencia puede estar explicada por sus características geográficas, ya que podrían dificultar la migración de animales infectados con otros genotipos desde otros países (Rajendran *et al.*, 2012; Dubey *et al.*, 2006c).

Es necesario resaltar que varios estudios han cuestionado la eficacia de los marcadores utilizados para tipificar las cepas de América del Norte y Europa para la determinación de la diversidad genética de las cepas de América del Sur, debido a las diferencias en la estructura poblacional de *T. gondii* en ambas regiones, que podrían llevar a clasificaciones imprecisas o incorrectas (Dardé *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2007; Sibley *et al.*, 2009). Es de esta manera que en los últimos años han aparecido otros sistemas de clasificación, como el desarrollado por Khan *et al.*, (2007) en el que se identifican 11 haplogrupos que recogen los 3 linajes clásicos e identifican grupos endémicos de América de Sur, un grupo distribuido globalmente y otros pertenecientes a otras regiones. Otro estudio realizado por Su *et al.*, (2012) analizó 956 cepas de todo el mundo utilizando 11 marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), con los que se logró clasificar a *T. gondii* en 6 clados distintos, denominados A-F.

2.2 Toxoplasmosis

2.2.1 Epidemiología

La toxoplasmosis es una zoonosis reemergente y cosmopolita que ha sido demostrada en 350 especies distintas de aves y mamíferos, en 31 de las 39 especies de felinos y se estima que un tercio de la población humana mundial ha tenido contacto con el parásito. Para estimar la prevalencia, los estudios utilizan diversas técnicas serológicas, aunque también se han utilizado pruebas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o los bioensayos en ratones, encontrándose variaciones entre las diferentes regiones geográficas debido a diversos factores (Tenter *et al.*, 2000; Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

La prevalencia de la infección en humanos varía según la región, siendo mayor en países de América Latina y África. Esto se debe tanto a factores ambientales (el clima de los países tropicales favorece el desarrollo y supervivencia de los ooquistes) como a factores antropogénicos (diferencias socio-culturales y económicas entre países) (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). De esta manera, Wang *et al.*, (2017) realizaron una revisión de la prevalencia de la infección por *T. gondii* en personas VIH positivas, y encontraron que las regiones con mayor prevalencia fueron Medio Oriente y África del Norte (60,7%), América Latina y el Caribe (49,1%) y África Sub-sahariana (44,9%); mientras que la región con menor prevalencia fue Asia-Pacífico (25,1%). El mismo estudio también reportó que los países con menores ingresos tenían mayor prevalencia (54,7%) que los de mayores ingresos (26,3%). Resultados similares fueron reportados por Foroutan-Rad *et al.*, (2016), que analizaron la prevalencia de *T. gondii* en donadores de sangre, encontrando también una mayor prevalencia en África (46%), y menor en

Asia (29%); además, los países con mayor prevalencia fueron Brasil (75%) y Etiopía (73%).

En el Perú, los estudios de la infección por *T. gondii* en humanos son escasos, y en su mayoría son reportes de casos y/o descripciones clínicas (Maguiña *et al.*, 1998; Cáceda Sánchez *et al.*, 2000; Eza *et al.*, 2006; Nunura *et al.*, 2010; Lacunza-Paredes y Boza-Marroquín, 2012; Samalvides *et al.*, 2014). Dentro de los estudios de prevalencia que se han realizado resalta el de Cantella *et al.*, (1974), que realizaron un estudio de seroprevalencia en las tres regiones geográficas, obteniendo una mayor prevalencia en la selva (47%), seguido de Lima (región costa, 42%) y por último, la sierra (9%). Además, Morales *et al.*, (1979) evaluaron la prevalencia de la infección por *T. gondii* en niñas escolares de San Jacinto, departamento de Ancash, por medio de la intradermorreacción con toxoplasmina, obteniendo una positividad en el 12,3% de las escolares muestreadas.

García *et al.*, (2002) y Lengua-Yonz *et al.*, (2013) realizaron estudios sobre la frecuencia de la toxoplasmosis ocular en el Instituto Nacional de Oftalmología (INO) durante los periodos de 1985-1999 y 2003-2007, respectivamente. Los resultados mostraron que, de los casos de uveítis analizados por el servicio de Úvea del INO, el 19,75% fue causada por toxoplasmosis ocular, siendo la principal zoonosis parasitaria observada en el periodo de 1985-1999 (García *et al.*, 2002); similarmente, se observó una frecuencia de 14,02% en el periodo de 2003-2007 (Lengua-Yonz *et al.*, 2013). Por último, Reátegui y Vela (2011) analizaron la seroprevalencia a *T. gondii* en mujeres embarazadas en dos hospitales de Iquitos por medio de la prueba de ELISA, obteniendo una positividad de 94,5% y 86,8% para IgG y de 3,1% y 10,5% para IgG e IgM. Esta alta prevalencia está relacionada con factores socioeconómicos (tipo de ocupación y tipo de vivienda) y epidemiológicos (ingesta de frutas y verduras sin lavar y cohabitación con animales).

2.2.2 Cuadros clínicos

En humanos, la infección por *T. gondii* puede generar varios cuadros clínicos con diversos grados de severidad que dependen de varios factores como la dosis de infección, el estado inmune del hospedero y la cepa del parásito.

La toxoplasmosis en individuos inmunocompetentes es normalmente asintomática, aunque se ha observado síntomas en el 10 – 20 % de los casos (Robert-Gangneux y Dardé, 2012; Sepúlveda-Arias *et al.*, 2014). La toxoplasmosis aguda puede presentar síntomas parecidos a la mononucleosis, como linfadenopatía, fiebre o dolor de garganta, pero en su forma más severa puede ocasionar mialgia, esplenomegalia, miocarditis, neumonía y problemas gastrointestinales, que han sido observados en algunas regiones de la Amazonía y en Brasil (Sepúlveda-Arias *et al.*, 2014; McLeod *et al.*, 2014). La infección aguda en mujeres embarazadas también es asintomática, por lo que puede pasar desapercibida, llegando a transmitir la infección al feto, lo que ocasiona el cuadro de toxoplasmosis congénita. Por otro lado, la infección crónica ha sido asociada a cambios conductuales y neurológicos, aunque la mayoría de estudios se han realizado en modelos animales (McLeod *et al.*, 2014).

La tasa de transmisión de la toxoplasmosis congénita depende del trimestre en el cual la madre ha adquirido la infección, siendo baja si la infección se produce en los primeros meses de embarazo (10 – 25%), aumentando a 30 – 50% en el segundo trimestre y a 60 – 70% en el tercer trimestre (McLeod *et al.*, 2014). Por el contrario, el cuadro clínico es más severo entre más temprana se presente la infección, e involucra a la retina y el sistema nervioso, produciéndose cuadros como retinocoroiditis, ceguera, microcefalia, calcificación intracraneal, retardo mental o psicomotor, hidrocefalia, entre otros (McLeod *et al.*, 2014).

La toxoplasmosis ocular puede ser consecuencia de una toxoplasmosis congénita, por una infección aguda adquirida post-natalmente o por la reactivación de una infección crónica (McLeod *et al.*, 2014), reportándose su presencia en el 2 – 19% de los casos de toxoplasmosis adquirida (Sepúlveda-Arias *et al.*, 2014). Los síntomas pueden aparecer en un tiempo variable después de la infección e incluyen coriorretinitis necrotizante focal y reacción inflamatoria vítrea; sin embargo, se ha observado la aparición de formas severas de toxoplasmosis ocular con fiebre prolongada, linfadenopatía crónica, fiebre y coriorretinitis recurrente. La ocurrencia de la forma severa en la toxoplasmosis ocular estaría relacionada con la infección con cepas atípicas y ha sido observada con mayor frecuencia en Sudamérica, lo cual es un indicador de la diferencia genética de las cepas encontradas en esta región, que puede influir en la aparición de este cuadro severo (Robert-Gangneux y Dardé, 2012; Sepúlveda-Arias *et al.*, 2014; McLeod *et al.*, 2014).

Las personas inmunocomprometidas son consideradas un grupo de alto riesgo, en las que la infección por *T. gondii* puede llegar a ser letal debido a que se produce una reactivación de la infección crónica, lo que puede generar cuadros severos que afectan mayormente al cerebro, o la diseminación del parásito a otros órganos, como los pulmones, los ojos y el corazón (Robert-Gangneux y Dardé, 2012; McLeod *et al.*, 2014). La encefalitis toxoplásmica es el cuadro clínico característico de la reactivación, e incluye una variedad de síntomas como dolores de cabeza, letargo, descoordinación, hemiparesis, pérdida de memoria, demencia, convulsiones, entre otros (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

2.2.3 Diagnóstico

Para el diagnóstico de la infección por *T. gondii* se han desarrollado una variedad de pruebas, que pueden ser serológicas, histológicas y moleculares. La detección de la infección es de suma importancia en mujeres embarazadas, personas inmunosuprimidas y pacientes involucrados en trasplantes, debido a la gravedad de los cuadros que presentan cuando se encuentran infectados.

El número de pruebas serológicas utilizadas para la detección de *T. gondii* ha ido aumentando desde que se diseñó la prueba de Sabin-Feldman o *dye-test* en 1948, que se basaba en la lisis parasitaria mediada por anticuerpos. A pesar de ser considerada un *gold standard*, la dificultad en su ejecución hace que actualmente sea realizada en muy pocos laboratorios (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Técnicas más actuales incluyen la inmunofluorescencia indirecta (IFI), las pruebas de hemaglutinación, *Western blot*, las pruebas de ELISA, entre otras. Las pruebas serológicas son utilizadas usualmente para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-*T. gondii*, lo que puede ayudar a identificar si la infección ha sido reciente o no; sin embargo, la interpretación de los resultados se dificulta cuando los niveles de IgG son bajos, por las diferencias de sensibilidad entre técnicas o porque se observó que la IgM puede persistir por más tiempo que el correspondiente a la etapa aguda. Para evitar estas dificultades, se han diseñado otras pruebas, como el ELISA de avidéz, que se basa en el incremento de la afinidad de IgG conforme hay un mayor tiempo de infección. Además, algunos laboratorios de referencia, como el Laboratorio de Referencia de Serología de Toxoplasma del Instituto de Investigación de la Fundación Médica de Palo Alto realizan paneles de pruebas serológicas que incluyen pruebas de ELISA para IgM, IgA e IgE, pruebas de avidéz, el *dye-test* para IgG y pruebas de aglutinación diferencial para evaluar de manera más exacta qué tan reciente es la infección (Robert-Gangneux y Dardé, 2012; Halonen y Weiss, 2013).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una prueba directa que comúnmente se utiliza para diagnosticar la infección *in utero* en mujeres embarazadas y en personas inmunocomprometidas, utilizando una variedad de muestras como fluidos intraoculares, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, lavado bronco-alveolar o sangre periférica. Se ha observado variaciones en la sensibilidad que dependen del tipo de prueba y del gen a analizar; de esta manera, se han diseñado protocolos para PCR convencional, PCR anidado y PCR en tiempo real; por otro lado, los genes más utilizados son el gen B1 y el REP - 529 (Halonen y Weiss, 2013; McLeod *et al.*, 2014).

El diagnóstico por técnicas histológicas no es muy común debido a que se debe realizar una biopsia para la obtención de la muestra, que es un procedimiento altamente invasivo y además porque actualmente existen otras metodologías como la imagen por resonancia magnética o la tomografía computarizada en el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral (Halonen y Weiss, 2013). A pesar de que la técnica de inmunohistoquímica ha demostrado ser altamente sensible y específica, su aplicación se da normalmente para la detección de parásitos y la descripción histopatológica en muestras de pacientes inmunosuprimidos analizados *post-mortem*, en infecciones de animales silvestres o en infecciones experimentales con modelos animales (Andres *et al.*, 1981; Conley *et al.*, 1981b; Montoya, 2002; Waree *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013).

2.3 Toxoplasmosis en el SNC

2.3.1 Histopatología

La infección de *T. gondii* en el cerebro ha sido asociada a diversas lesiones observadas tanto en humanos como en modelos animales utilizados. Mientras que la infección aguda en humanos normalmente afecta otros órganos, la infección

crónica en individuos inmunocompetentes ha sido relacionada con posibles cambios de comportamiento y enfermedades neurológicas, lo que podría significar una influencia de *T. gondii* en el normal funcionamiento cerebral. En personas inmunosuprimidas se desarrolla encefalitis o meningoencefalitis, necrosis, nódulos microgliales e inflamación perivascular severa, así como la presencia de quistes y taquizoitos extracelulares (Ferreira y Borges, 2002; Chirch y Luft, 2007).

En modelos murinos se ha estudiado más detalladamente la histopatología de la toxoplasmosis cerebral en sus distintas fases, aunque la severidad y extensión de las lesiones varían según el modelo experimental empleado. En general, la infección aguda y crónica se caracterizan por la presencia de infiltrados celulares perivasculares, meníngeos y parenquimales con participación de linfocitos, células polimorfonucleares, plasmáticas y/o mononucleares; esta reacción inflamatoria puede aparecer desde las primeras semanas de infección, dependiendo del caso (Conley y Jenkins, 1981a; Kittas *et al.*, 1984; Hermes *et al.*, 2008; Gulinello *et al.*, 2010). Los nódulos de inflamación parenquimales pueden o no contener material inmunorreactivo a *T. gondii*. Ferguson *et al.*, (1991) reportaron que la mayoría de nódulos eran negativos al antígeno parasitario en la fase crónica (de 1 a 22 meses p.i); mientras que Conley y Jenkins (1981a) observaron que hubo generación de nuevos nódulos inflamatorios inmunorreactivos en una infección crónica tardía, entre las 7 y 15 semanas post infección.

Adicionalmente, en algunos casos se han observado focos de necrosis, calcificaciones e inflamación en la fisura intrahemisférica y en las proximidades del hipocampo. Por otra parte, una característica conservada entre los estudios es que la presencia de quistes no está necesariamente asociada a las lesiones observadas (Conley y Jenkins, 1981a; Ferguson *et al.*, 1991; Hermes *et al.*, 2008; Gulinello *et al.*, 2010; Berenreiterová *et al.*, 2011).

En los modelos de reactivación de la infección se han utilizado varias drogas para inmunosuprimir animales en la fase crónica, como la dexametasona, la cortisona acetato, la ciclofosfamida, la ciclosporina, entre otros. En general, la carga parasitaria de los animales inmunosuprimidos es mayor a la de los animales crónicos (Djurković-Djaković y Milenković, 2001; Kang *et al.*, 2006; Mose *et al.*, 2017). Sin embargo, en algunos modelos, como el utilizado por Sumyuen *et al.*, (1996), no se detectaron dichas diferencias cuando utilizaron cortisona acetato, azatioprina o la combinación de ambas. Aún así, se considera que la reactivación de la infección crónica implica necesariamente la proliferación de *T. gondii*, que conlleva a un aumento de la carga parasitaria.

Así como en los modelos de infección crónica, la patología cerebral en individuos inmunosuprimidos se caracteriza por la presencia de infiltración perivascular y meníngea, representando un cuadro de meningoencefalitis, además de la presencia de nódulos gliales y parenquimales y focos de necrosis (Djurković-Djaković y Milenković, 2001; Mose *et al.*, 2017). En algunos casos la severidad de las lesiones fue mayor debido a las dosis más altas de inmunosupresor administrado (Mose *et al.*, 2017); en otros estudios, la severidad de la inflamación linfocítica fue similar en grupos con o sin inmunosupresión (Nicoll *et al.*, 1997). También ha sido reportada una disminución en la infiltración linfocítica, microgliosis y astrocitosis en los individuos inmunosuprimidos (Mose *et al.*, 2017). Adicionalmente, los animales inmunosuprimidos muestran un tiempo de vida menor al de los controles o los no inmunosuprimidos, mostrando tasas de mortalidad de hasta 85% (Djurković-Djaković y Milenković, 2001). Dicha mortalidad está relacionada con la aparición de síntomas clínicos de TE, así como con la dosis de inmunosupresor administrada (Djurković-Djaković y Milenković, 2001; Mose *et al.*, 2017).

2.3.2 Tropismo de *T. gondii* en el cerebro

La distribución de *T. gondii* en el cerebro ha sido estudiada en modelos animales para determinar si hay un tropismo marcado del parásito hacia ciertas regiones cerebrales que pueda justificar los cambios de comportamientos observados en dichos modelos. La diversidad de resultados obtenidos en estos trabajos se relaciona con el modelo experimental usado y también con la cantidad de áreas cerebrales analizadas.

En cuanto a la ubicación de los quistes en las divisiones macroscópicas del cerebro, en algunos casos se ha encontrado mayor cantidad de quistes en áreas comprendidas en el telencéfalo (corteza cerebral, ganglios basales y sistema límbico) y menor cantidad en áreas pertenecientes al metencéfalo (cerebelo y puente de Varolio) y al bulbo raquídeo (Verma y Bowlest, 1967; Berenreiterová *et al.*, 2011); sin embargo, Hermes *et al.*, (2008) observaron la mayor carga parasitaria en el diencéfalo, comparado con otras áreas del telencéfalo (corteza e hipocampo).

Se ha encontrado una alta carga parasitaria en varias áreas corticales, el bulbo olfatorio, el hipocampo y la amígdala, aunque los resultados varían entre estudios. De esta manera, Berenreiterová *et al.*, (2011) hallaron mayor densidad quística en la capa plexiforme del bulbo olfatorio, el *pallidum* ventral y las cortezas entorrinal, somatosensorial, motora y orbital; y con menor frecuencia, las cortezas asociativa frontal y visual, la *tenia tecta*, el hipocampo y la amígdala. En contraste, Haroon *et al.*, (2012) analizaron la carga parasitaria a los 30 dpi y 60 dpi, encontrando una disminución en el número de quistes en la corteza, el tálamo, el hipocampo y el núcleo estriado y manteniéndose o aumentando en el hipotálamo, la amígdala, el bulbo olfatorio, el cerebelo y el tallo encefálico. Gatkowska y Wieczorek (2012) analizaron la carga parasitaria en la amígdala y el hipocampo, encontrando una

ligera mayor carga en el hipocampo a las 3 semanas p.i. y en la amígdala a las 6 semanas p.i.

En modelos murinos de inmunosupresión, Dellacasa-Lindberg *et al.*, (2007) analizaron la distribución de los focos de recrudescencia por medio de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* e inmunohistoquímica, observando que hubo una distribución irregular de los focos de recrudescencia, encontrándose mayor cantidad en la materia gris de las cortezas frontal y parietal, aunque algunos animales de experimentación también presentaron parásitos en los ganglios basales. Además no observaron un alto grado de reactivación en las meninges, el plexo coroideo y el cerebelo, siendo en menor cantidad y más pequeños los focos encontrados en este último.

A pesar de que algunos estudios como los de Gatkowska y Wieczorek (2012) y Haroon *et al.*, (2012) han podido establecer una posible relación entre el tropismo de *T. gondii* hacia alguna región cerebral y los cambios de comportamiento observados en modelos experimentales, la gran variabilidad entre los resultados de los diversos trabajos realizados han hecho imposible llegar a una conclusión definitiva. En los últimos años se han analizado otros posibles mecanismos por los cuales *T. gondii* podría alterar el funcionamiento normal del cerebro, como la alteración del metabolismo de la dopamina, un neurotransmisor importante en el SNC (Prandovszky *et al.*, 2011; Parlog *et al.*, 2015). Sin embargo, otros estudios no han podido verificar algún tropismo de *T. gondii* hacia regiones pertenecientes al sistema dopaminérgico (Berenreiterová *et al.*, 2011). Es posible que no solo la distribución cerebral parasitaria sea el único mecanismo por el cual el parásito manipula el comportamiento de su hospedero, sino que corresponda a una combinación de los efectos directos e indirectos que *T. gondii* tiene en las neuronas (Parlog *et al.*, 2015).

2.3.3 Respuesta inmune a *T. gondii* en el cerebro

A pesar de ser un órgano inmunológicamente privilegiado, la proliferación de *T. gondii* en el cerebro genera una respuesta inmune mediada tanto por células residentes como infiltradas de la periferia. En la etapa aguda, *T. gondii* atraviesa la barrera hemato-encefálica (BHE) posiblemente a través de un mecanismo de “caballo de Troya”, en el cual el parásito infecta células de la periferia e induce en ellas un fenotipo migratorio que facilita su ingreso por la BHE; otro posible mecanismo es la transmigración paracelular, en la que *T. gondii* pasaría activamente entre células del endotelio (Elsheikha y Khan, 2010; Kamerkar y Davis, 2012). Una vez en el parénquima cerebral, los taquizoitos proliferan e infectan varios tipos celulares, como la microglia, los astrocitos y las neuronas; aunque se ha observado que los astrocitos y la microglia activados inhiben la replicación intracelular parasitaria, siendo la producción de óxido nítrico (NO) el mecanismo utilizado por la microglia (Chao *et al.*, 1993; Scharton-Kersten *et al.*, 1997; Kamerkar y Davis, 2012).

Es reconocida la importancia del IFN- γ en el control de la replicación parasitaria en la fase aguda debido a que participa en la activación de la microglia y estimula la expresión tanto de MHC I y II en células gliales y neuronas como de quimiocinas, como la CXCL9 y CXCL10, que reclutan linfocitos T al parénquima cerebral (Wang y Suzuki, 2007). Sin embargo, es necesaria la participación y el balance entre las citoquinas pro y anti-inflamatorias, ya que se ha reportado que los ratones deficientes en IFN- γ , su receptor (IFN- γ R) o IL-12 mueren en la etapa aguda debido al deficiente control en la replicación parasitaria; mientras que los ratones deficientes en IL-10 o IL-4 mueren por los efectos nocivos producidos por el exceso de las citoquinas pro-inflamatorias (Alexander *et al.*, 1997). Se han identificado como principales productores de IFN- γ a los linfocitos T, aunque

también se ha detectado su producción en la microglia/macrófagos infiltrados (Wang y Suzuki, 2007).

El estrés provocado por la respuesta inmune puede desencadenar la conversión de taquizoito a bradizoito, lo que a su vez permite el inicio de la fase crónica de la infección (Skariah *et al.*, 2010; Lüder y Rahman, 2017). La latencia de *T. gondii* es mantenida por los linfocitos T y por la acción de IFN- γ y de TNF- α , que previenen la reactivación de la infección (Scharton-Kersten *et al.*, 1997; Kang y Suzuki, 2001; Blanchard *et al.*, 2015). En esta etapa el rol de la microglia es de mucha importancia, ya que secreta citoquinas pro y anti-inflamatorias, quimiocinas y moléculas con capacidad antiparasitaria como el óxido nítrico, que cumple un rol destacado, ya que se ha observado que la inhibición de su producción resulta en la reactivación de la infección (Alexander *et al.*, 1997; Blanchard *et al.*, 2015; Dincel y Atmaca, 2015). En hospederos inmunosuprimidos, ocurre la ruptura de los quistes durante el descenso de la producción de citoquinas como IFN- γ , aunque se desconoce si el parásito detecta este déficit en la respuesta inmune o si dicha ruptura se da normalmente durante la infección (Mcfarland *et al.*, 2016). Esta proliferación parasitaria estimula una nueva infiltración de células de la periferia y la producción de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α , además de observarse la activación de linfocitos T, células dendríticas y células del parénquima cerebral, lo que a su vez causa la aparición del cuadro clínico de encefalitis toxoplásmica (Mcfarland *et al.*, 2016).

III. HIPÓTESIS

Existen diferencias histológicas durante el proceso inflamatorio de la toxoplasmosis cerebral aguda, crónica y reactivada desarrolladas en modelo murino.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

- Evaluar las diferencias del proceso inflamatorio de la toxoplasmosis cerebral.

4.2 Objetivos específicos:

- Demostrar el efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida en modelo murino.
- Determinar la carga parasitaria cerebral en ratones con toxoplasmosis aguda, crónica y reactivada.
- Determinar la activación de la microglia en ratones con toxoplasmosis aguda, crónica y reactivada.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cepa de *Toxoplasma gondii*

Se utilizó la cepa Me49 de *T. gondii*, donada por la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para la infección de ratones.

Se utilizó antígeno total de *T. gondii* cepa RH, donado por la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para la realización de las pruebas de ELISA.

5.2 Diseño experimental

Se utilizaron 18 ratones *Swiss* hembras de dos meses de edad, que fueron adquiridos del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Los ratones fueron divididos en cuatro grupos: tres de ellos como grupos de infección, de cinco ratones cada uno, y un grupo control de tres ratones. El primer grupo de infección se utilizó para el estudio de la toxoplasmosis aguda (Grupo A: 18 días de infección), el segundo grupo para el estudio de la toxoplasmosis crónica (Grupo B: 120 días de infección) y el tercer grupo para el estudio de la toxoplasmosis reactivada (Grupo C: 165 días de infección con tratamiento inmunosupresor). En el grupo control, cada uno de los ratones fue asignado como control de un distinto grupo de infección y sujeto a las mismas condiciones experimentales (mismas fechas de muestreo, de sacrificio y aplicación o no del tratamiento inmunosupresor) (Figura 3).

Los ratones fueron infectados por vía oral con una dosis de 7 a 15 quistes tisulares, obtenidos de un homogeneizado cerebral de un ratón con toxoplasmosis crónica previamente infectado.

El sacrificio se realizó de acuerdo al tiempo de infección establecido para cada grupo, con 100 µL de Xylacina (Dormi-Xyl® 2, Agrovvet Market S.A) y Ketamina (Ket-A-100®, Agrovvet Market S.A), en proporción 1:10. Se inició la disección de los ratones una vez que no mostraron reflejo podal y se procedió a la extracción del cerebro, que fue lavado con solución salina estéril y guardado en PBS-formol 10% por 24 horas, después de lo cual se lavó con agua y se almacenó en alcohol de 70° hasta su procesamiento.

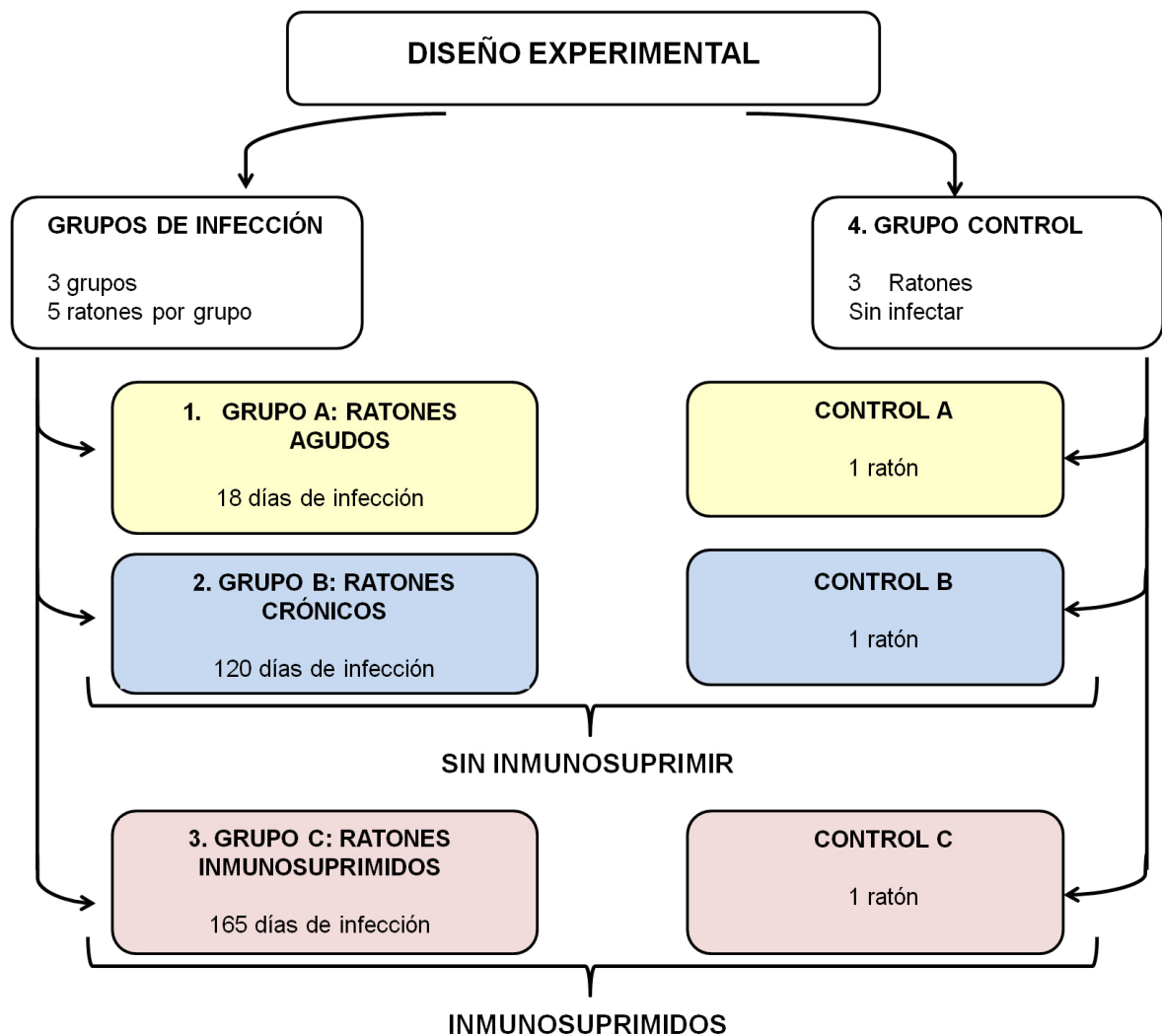


Figura 3. Diseño experimental de los grupos de trabajo en ratones.

5.3 Determinación del efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida

Para corroborar la eficacia del esquema de inmunosupresión ejecutado, se realizó el conteo total de leucocitos y la cinética de anticuerpos anti – *T. gondii*.

5.3.1 Inmunosupresión

La inmunosupresión se realizó en el grupo C y su respectivo control por inoculación diaria de ciclofosfamida (Quality Pharma S.A) por vía intraperitoneal, en una dosis de 125 mg/Kg, por seis días (desde el día 159 hasta el 164 dpi).

5.3.2 Toma de muestra

Para realizar el conteo total de leucocitos, se colectó aproximadamente 20 μ L de sangre periférica de los ratones en tubos con EDTA, mientras que para la cinética de anticuerpos, se obtuvo suero a partir de aproximadamente 100 μ L de sangre que fue centrifugada inmediatamente.

El muestreo se realizó por el extremo apical de la cola a los 0, 14, 28, 56, 84, 113, 158 días (pre-inmunosupresión) y 165 (post-inmunosupresión) días de infección (dpi), según cada grupo. Una vez finalizado el muestreo, se procedió a cicatrizar la cola con Hemorrexin (Mercuria Laboratorios S.A).

5.3.3 Conteo total de leucocitos

Para el conteo total de leucocitos, se modificó el protocolo descrito por Barrera y Oporta, (2014). Para esto, se mezcló 20 μ L de sangre con 380 μ L de reactivo de Turk, obteniéndose una dilución 1:20. Posteriormente, se realizó el conteo de las células presentes en los cuatro cuadrantes periféricos de una cámara de Neubauer.

Para calcular el número total de leucocitos se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de leucocitos (células } \times \mu\text{L}^{-1}) = \frac{N^{\circ} \text{ leucocitos contados (en 4 cuadrantes)}}{\frac{1}{10} \times \frac{1}{20} \times 4}$$

5.3.4 Cinética de anticuerpos IgG e IgM anti-*T. gondii*

Se determinó la cinética de anticuerpos IgM e IgG anti-*T. gondii* utilizando el suero obtenido de tres ratones inmunosuprimidos: dos ratones infectados correspondientes al grupo C y el ratón control C.

Se adaptó el protocolo de ELISA para detección de IgM e IgG anti-*T. gondii* descrito por Galván-Ramírez *et al.*, (2010). Para ello, se sensibilizó cada pocillo de la placa (NuncMaxisorp, ThermoScientific) con 100 μL de antígeno total de *T. gondii* en solución amortiguadora de carbonatos a una concentración final de un $\mu\text{g/mL}$ y se dejó incubando por toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó tres veces con tampón fosfato salino (PBS) con Tween al 0.05% (PBS-T), dos veces más con PBS y se realizó el bloqueo a 37°C por 30 minutos con PBS-T más leche descremada al 5%. Después, se procedió a lavar de la misma manera con PBS-T y PBS. Se agregó 100 μL a cada pozo del suero diluido en PBS-T (1:150 para IgG y 1:50 para IgM), se dejó incubando por dos horas a 37°C y se lavó con PBS-T y PBS como descrito anteriormente. A continuación, se agregó a cada pozo 100 μL de conjugado diluido en PBS-T: 1:1000 para IgG (Sigma-Adrich®, Cat.No. A9044) y 1:250 para IgM (Chemicon, Cat. No. AP128P), se dejó incubando por dos horas a 37 °C; y se realizó nuevamente otro lavado. Para el revelado, se agregó a cada pocillo 100 μL de cromógeno por cinco minutos y se detuvo la reacción con 50 μL de ácido sulfúrico 2 N por pozo. La lectura se realizó a 492 nm.

5.4 Determinación de carga parasitaria e histopatología

5.4.1 Procesamiento histológico

A todos los cerebros fijados se les dividió en tres secciones de un espesor de 3 a 5 mm, correspondientes a la región anterior y posterior del cerebro y al cerebelo. Para su procesamiento, cada sección fue deshidratada por pasajes consecutivos en una batería de alcoholes, consistente en alcohol de 70°, 90° y 96° (30 minutos por cada pasaje) y alcohol absoluto (tres veces por 45 minutos); luego fueron aclaradas con Xilol (tres veces por 45 minutos) e infiltradas con parafina (Paraplast®, Leica Biosystems) (tres veces por 60 minutos). Posteriormente se procedió a incluir las secciones de cerebro en bloques de parafina que se utilizaron para realizar cortes histológicos de cinco μ m utilizando un micrótopo (Biobase Biodustry, modelo BK-202).

5.4.2 Coloración Hematoxilina – Eosina (HE)

Se colorearon todos los cortes obtenidos de la región anterior y posterior del cerebro, así como los del cerebelo de todos los ratones.

Para realizar la coloración HE, se procedió a desparafinar las láminas con xilol (dos veces por cinco minutos) y luego se rehidrataron con una batería de alcoholes absoluto (dos veces), alcohol 96°, alcohol 90° y alcohol 70° (cinco minutos). Luego, se lavaron las láminas con agua corriente y fueron sumergidas en hematoxilina de Harris por un minuto; en alcohol ácido 1% por tres segundos y en eosina por 30 segundos; habiendo entre cada paso y al final de la coloración un lavado con agua corriente.

Realizada la coloración, las láminas fueron sumergidas tres veces en alcohol de 70° y 90° y pasadas por tres minutos por alcohol de 96°, absoluto y xilol. Se

realizó el montaje de láminas utilizando Entellán (Merck, Cat. No. 107961). Las láminas se dejaron secar hasta al día siguiente para su lectura.

Después de la observación al microscopio a aumentos de 100X y 400X, se seleccionó solo una sección de cerebro (anterior o posterior) de cada ratón para realizar las pruebas de inmunohistoquímica. Dichas secciones fueron elegidas de acuerdo a la mayor presencia de quistes y de lesiones (presencia de infiltración perivascular o nódulos inflamatorios).

5.4.3 Análisis de carga parasitaria cerebral

Para determinar la carga parasitaria, se procedió a contar el número de quistes presentes en tres cortes de cerebelo y tres cortes de cerebro coloreado con HE. Se anotó la ubicación de los quistes en el cerebelo (capa molecular, capa granular, capa de células de purkinje y sustancia blanca) y en el cerebro (hipocampo, hipotálamo, tálamo, corteza).

5.5 Determinación de la activación de la microglia

5.5.1 Pruebas de inmunohistoquímica

Las pruebas de inmunohistoquímica se realizaron en los cortes histológicos que se encontraban fijados en láminas cargadas con Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich®, Cat. No. P8920). Se siguió el protocolo de Gutierrez (2016) con algunas modificaciones tanto para la detección de antígeno parasitario como de la microglia.

Se procedió a desparafinizar las láminas obtenidas a 56°C por 15 minutos y una inmersión en xilol por un minuto; este proceso se repitió tres veces. Posteriormente, las láminas pasaron por dos pasajes de xilol, el primero de 10

minutos y el segundo de cinco minutos y luego por una batería de alcohol absoluto, 96°, 70° y agua destilada, cada uno por cinco minutos.

Posteriormente, se procedió al rescate antigénico utilizando buffer citrato pH 6.0 a 95°C por 30 minutos, después de lo cual se procedió a realizar bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 6% (diluido en PBS) por 30 minutos. Seguidamente se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.05% por cinco minutos cada uno, luego, se agregó la solución de bloqueo de inespecificidades por 30 minutos y se realizaron otros tres lavados más. Las láminas fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en PBS. Se utilizaron los anticuerpos anti-*T. gondii* (ThermoFisher Scientific, Cat. No. PA1-73002, dilución 1:200) y anti-Iba-1 (ThermoFisher Scientific, Cat. No. PA5-21274, dilución 1:50) y se dejó en incubación durante toda la noche a 4°C.

Después de la incubación, se procedió a lavar tres veces más y se incubó con el anticuerpo secundario en una dilución 1:100 por 40 minutos (Goat anti-rabbit IgG biotin conjugated, Chemicon® International, Cat. No. AP132B). Posteriormente, se siguió lavando con PBS-Tween 0.05% y se incubó con estreptavidina – peroxidasa (HRP) (IHC Select® Streptavidin-HRP prediluted, Sigma-Aldrich®, Cat. No. 20774) por 40 minutos. Finalmente, se agregó 3,3-Diaminobenzidina (DAB Tetrahydrochloride 50X, Merck, Cat. No. 281751) diluido en buffer Tris-HCl 100 mM (1:50 v/v), según indicaciones del producto, se mantuvo la reacción por 30 - 60 segundos y se detuvo la reacción con agua destilada. Se realizó la coloración de contraste con Hematoxilina diluida en agua destilada (1:2 v/v), se eliminó el exceso con agua destilada y se deshidrataron las láminas con la batería de alcoholes y xilol previamente utilizada, tres minutos por cada pasaje. Las láminas se montaron con Entellan (Merck, Cat. No. 107961) para su posterior observación.

5.5.2 Determinación de la presencia de microglia activada

Se analizó la presencia de la microglia activada en el hipocampo, en las subregiones *Cornu Ammonis 1* (CA1), y *Dentate Gyrus* (DG).

Para hallar el ratio de la microglia activada, se procedió a contar el número de células inmunorreactivas a Iba-1 que presentaron cambios morfológicos relacionados a la activación y se dividió entre el total de células inmunopositivas al marcador Iba-1 en un campo de 400X. Para esto, se tomó como microglia en estado de reposo a aquellas células inmunoreactivas que presentaban un soma pequeño y circular, del cual se proyectaban varios procesos largos y delgados (microglia ramificada); mientras que la microglia activada se presentó de dos formas: como microglia hipertrófica, cuando los somas eran alargados con proyecciones cortas y gruesas y como microglia ameboide, cuando los somas eran grandes con pocas proyecciones o sin ellas.

5.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con estadística no paramétrica utilizando el software SPSS® versión 23. En todos los casos, se consideraron valores $p < 0,05$ como estadísticamente significativos.

Para la comparación de los niveles de leucocitos dentro de un mismo tratamiento, se utilizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas. Para la comparación entre tratamientos diferentes, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba *post hoc* de Dunn con ajuste de Bonferroni. Finalmente, para la comparación de todos los tratamientos se utilizó la prueba de Friedman.

VI. RESULTADOS

6.1 Efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida

Los ratones inmunosuprimidos exhibieron cambios de conducta después de la administración de la primera dosis de ciclofosfamida, mostraron letargia y disminución del apetito; dichos cambios se acentuaron con las sucesivas dosis.

En el grupo C se observó un descenso significativo del número total de leucocitos ($p = 0,043$) entre las mediciones basales (día 0) y post-inmunosupresión (día 165); dicho descenso también fue observado en el control inmunosuprimido (control C). Por otro lado, no hubo un descenso significativo en los ratones crónicos (grupo B; $p=0,465$) y el control sin inmunosuprimir (control B) mostró valores similares en las mediciones basal y a los 113 días (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la inmunosupresión en el conteo total de leucocitos

GRUPO	LEUCOCITOS ($10^4/\mu\text{L}$)		
	0 d	113 d	165 d
Inmunosuprimido (Grupo C)	1,25 \pm 0,55	---	0,09 \pm 0,04*
Control IS (Control C)	0,99	---	0,19
Crónico (Grupo B)	1,63 \pm 0,66	1,80 \pm 0,29	---
Control Crónico (Control B)	1,87	1,53	---

*Diferencia significativa ($p<0.043$) en relación a la medición basal.
Control IS = Control de inmunosupresión

En cuanto a la cinética de anticuerpos, se observó un incremento de IgM en los primeros días de infección en el grupo C, alcanzando un pico a los 56 dpi (Figura 4 A). Por otro lado, la producción de IgG empezó a incrementar desde los 28 dpi, alcanzando un pico a los 158 dpi. En ambos casos, la producción de anticuerpos bajó después del tratamiento inmunosupresor (165 dpi) (Figura 4 B).

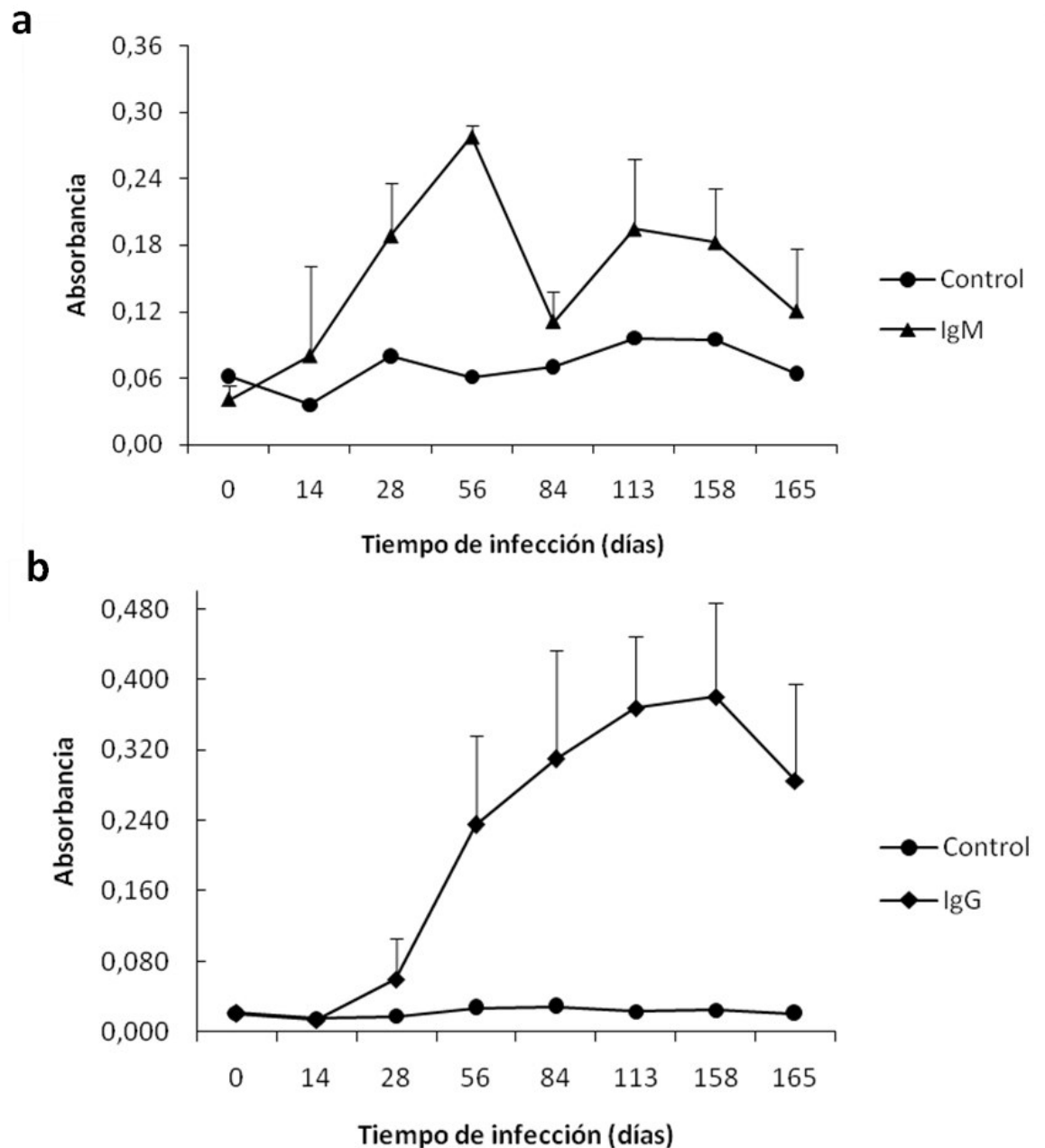


Figura 4. Niveles de anticuerpos anti-*T. gondii* en ratones del grupo C. (a) Niveles de IgM (b) Niveles de IgG.

6.2 Análisis de carga parasitaria, distribución de quistes y patología

Se observó la presencia de quistes en todos los grupos de infección, tanto por la coloración HE o por inmunohistoquímica (Figura 5 A,B). No se detectó la presencia de antígeno parasitario en el parénquima cerebral o asociado a nódulos de inflamación en ninguno de los grupos de infección.

En el cerebelo se observó una mayor cantidad de quistes en los ratones en fase aguda de infección en comparación con los que se encontraban en fase crónica y los inmunosuprimidos; sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Figura 5 C,D). Tres de cinco ratones (60%) presentaron quistes en el cerebelo en la fase aguda; en la fase crónica, dos de cinco (40%) y en la reactivada, uno de cinco (20%). La diferencia del número de quistes observados entre la sustancia gris y la sustancia blanca no fue significativa en ninguno de los grupos, aunque se observó una cantidad de hasta cinco veces mayor en la sustancia gris en los grupos en fase aguda y crónica (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidad media de quistes en cerebelo de ratones infectados

GRUPO	CEREBELO		
	Sustancia gris	Sustancia blanca	TOTAL
Agudo (Grupo A)	2,00 ± 2,12	0,40 ± 0,55	2,40 ± 2,61
Crónico (Grupo B)	0,50 ± 0,58	--	0,50 ± 0,58
Inmunosuprimido (Grupo C)	0,20 ± 0,45	0,20 ± 0,45	0,40 ± 0,89

En el cerebro, se encontró una cantidad de quistes de hasta 19 veces mayor en los ratones crónicos en comparación a los agudos y los inmunosuprimidos, pero la diferencia solo fue significativa entre los dos primeros grupos ($p=0.003$). Por otro lado, el análisis del número de quistes en el hipocampo, la corteza, el tálamo y el hipotálamo

reveló la ausencia de diferencias significativas en las cuatro zonas cerebrales (Tabla 3).

Por último, la diferencia del número total de quistes entre el cerebro y el cerebelo tampoco fue significativa en ninguno de los tres grupos.

Tabla 3. Cantidad media de quistes en cerebro de ratones infectados

GRUPO	CEREBRO				
	Hipocampo	Corteza	Tálamo	Hipotálamo	TOTAL
Agudo (Grupo A)	--	--	0,20 ± 0,45	--	0,20 ± 0,45
Crónico (Grupo B)	2,00 ± 1,15	5,50 ± 5,26	2,25 ± 1,50	1,25 ± 1,50	11,00 ± 8,12*
Inmunosuprimido (Grupo C)	0,20 ± 0,45	0,80 ± 0,84	0,60 ± 0,89	0,20 ± 0,45	1,80 ± 1,10

* Diferencia significativa ($p=0.003$) en relación al grupo A.

En cuanto a la patología cerebral, la mayoría de los quistes no estaban en proximidad a las lesiones inflamatorias, aunque se observó unas pocas excepciones (Figura 5E,F). La inflamación en todos los casos fue leve, siendo similar entre los ratones en fase crónica y los ratones en fase aguda, con la diferencia de que en los primeros se detectó inflamación meníngea (Figura 6D). En dos de los cinco ratones inmunosuprimidos (40%) se observó inflamación meníngea, perivascular y presencia de nódulos (Figura 6). También se observó inflamación en la fisura intrahemisférica (Figura 6D) y tanto en los alrededores (Figura 6E) como dentro (Figura 6F) del hipocampo. Ninguno de los ratones control presentó inflamación (Figura 6A,C).

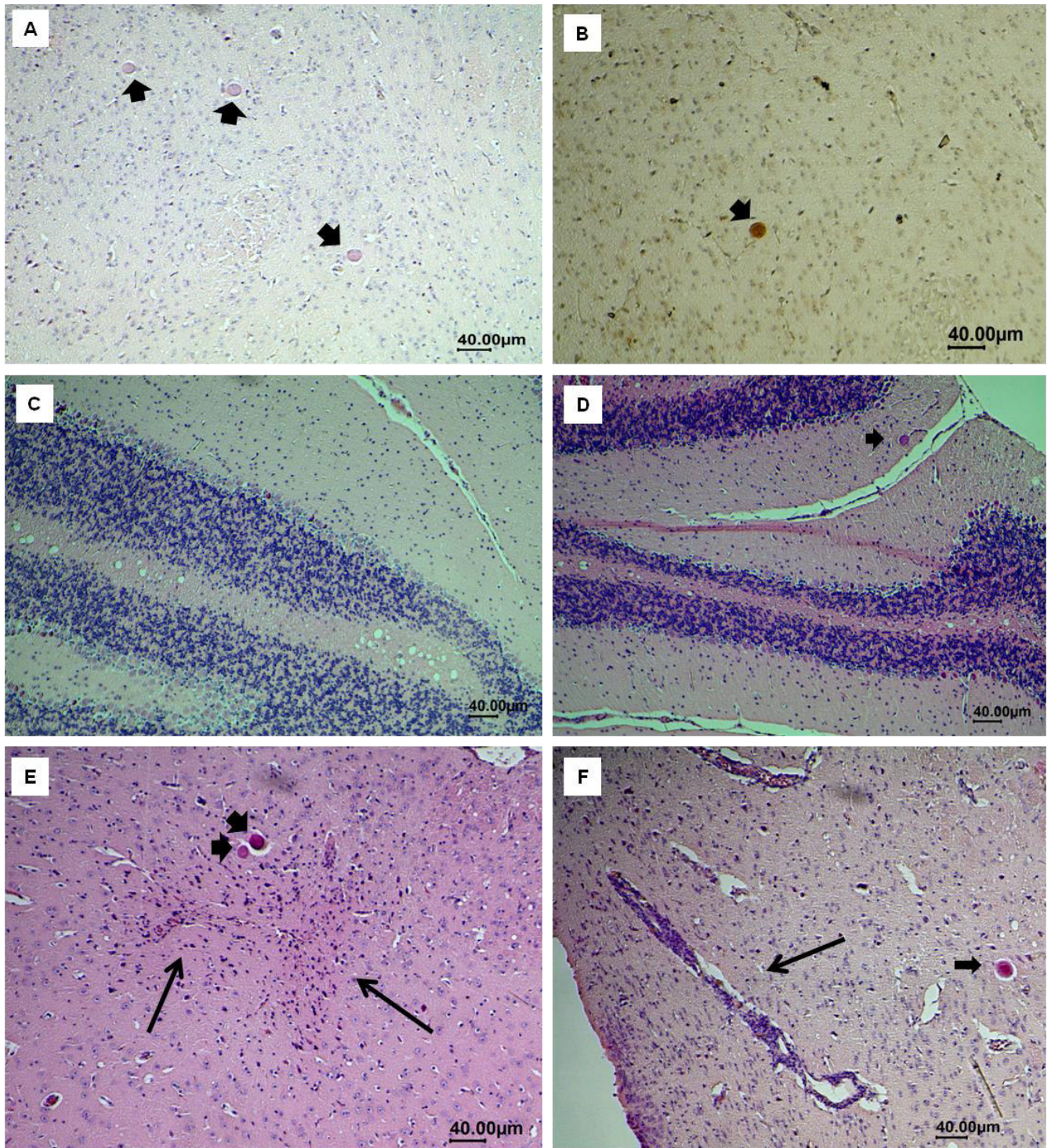


Figura 5. Resultados histopatológicos en los grupos de infección. (A) Presencia de quistes (flechas) en el parénquima cerebral, detectado por HE y (B) por inmunohistoquímica. (C) Cerebelo de un ratón control, sin presencia de quistes. (D) Quiste (flecha) en capa molecular del cerebelo en un ratón con infección aguda. (E) Presencia de infiltración parenquimal difusa (flechas delgadas) en proximidad a quistes (flechas gruesas). (F) Presencia de inflamación perivascular (flecha delgada) en proximidad a un quiste (flecha gruesa). Aumento: 100X (A – F).

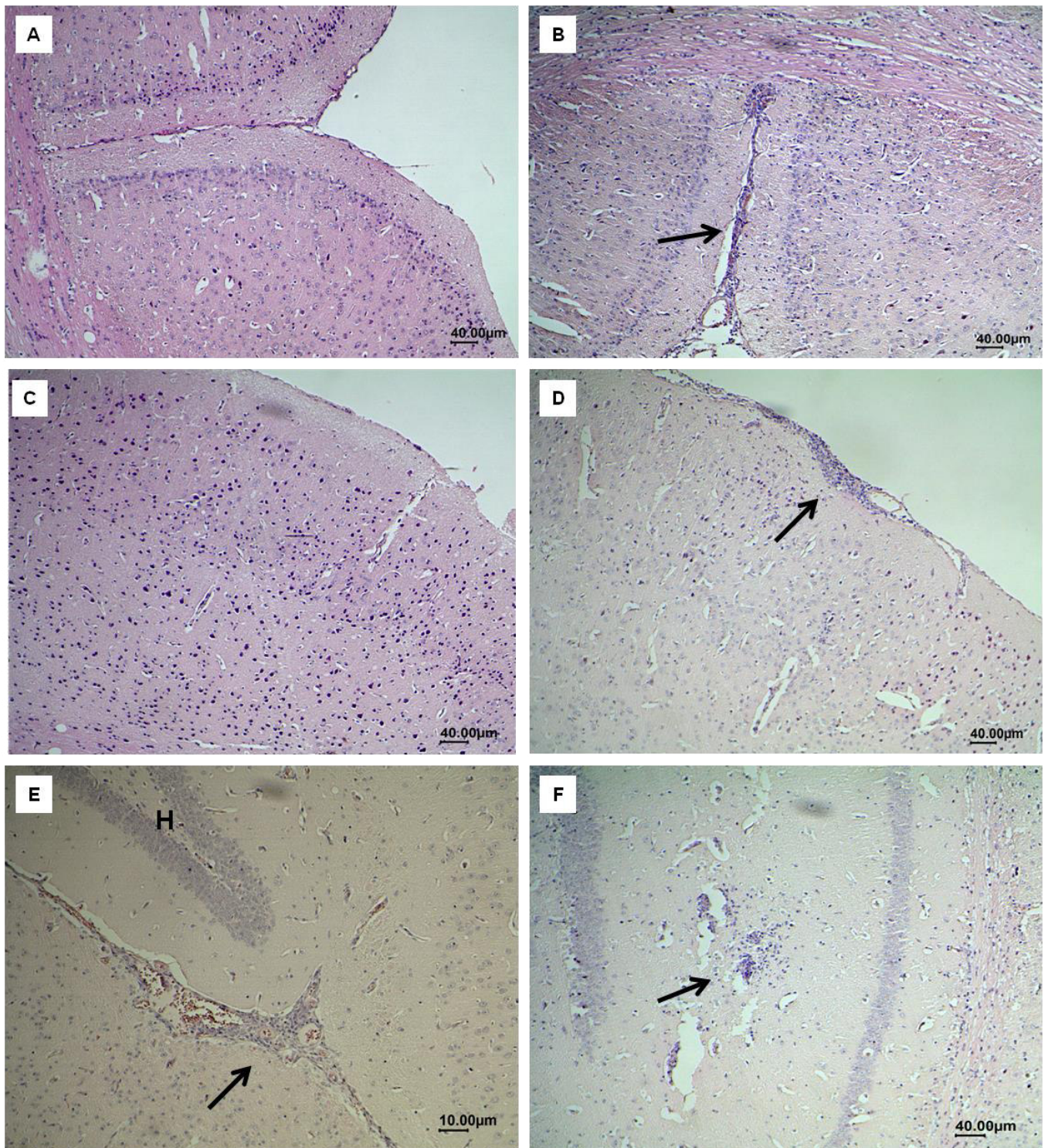


Figura 6. Diversas formas de inflamación observadas en los grupos de infección. (A, C) Ratones control sin presencia de inflamación. (B, D, E, F) Lesiones inflamatorias observadas en los ratones infectados.
H: Hipocampo
Aumento: 100X (A-F).

6.3 Evaluación de la activación de la microglia

La microglia activada presentó un soma celular hipertrófico, del cual se proyectaban procesos celulares cortos y gruesos. Por otro lado, la microglia no activada presentó un soma redondo y pequeño, con varios procesos largos y delgados (Figura 7A - C). Se evaluó la activación de la microglia cerebral en base a los cambios morfológicos observados en las células inmunoreactivas a Iba-1, presentes en las regiones CA1 y DG del hipocampo (Figura 7D).

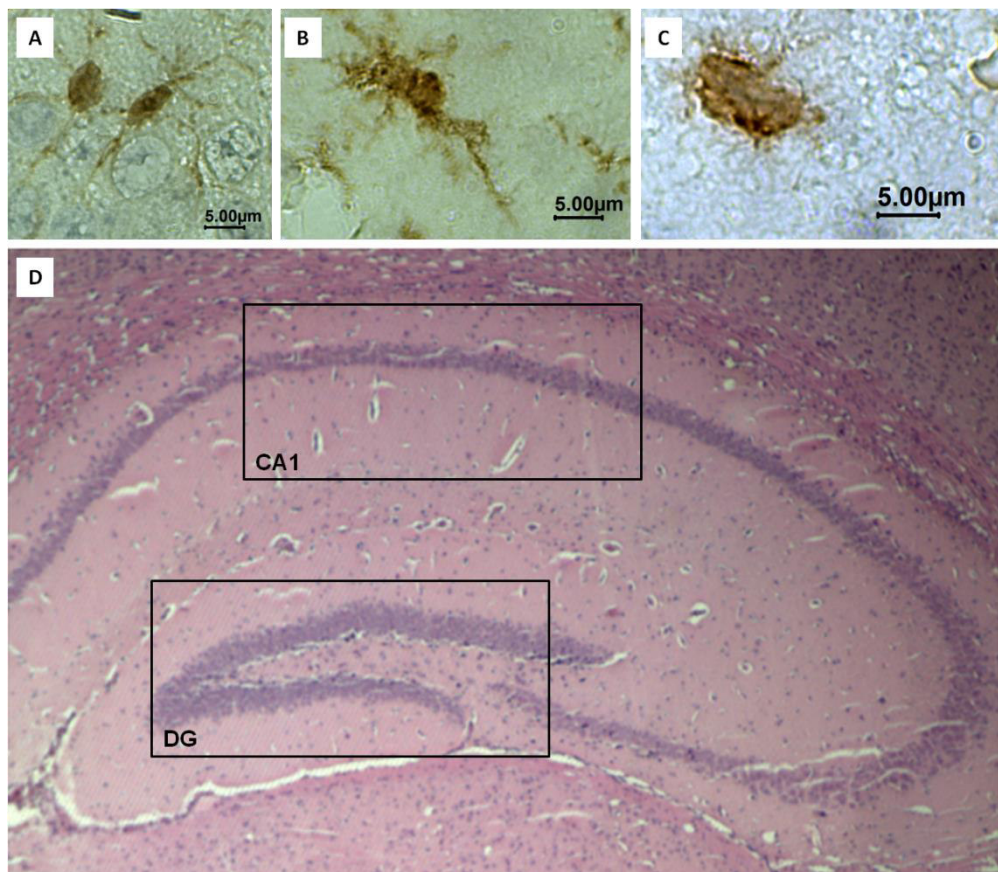


Figura 7. Morfología de la microglia y regiones analizadas del hipocampo. (A) Microglia ramificada o no activada, con soma celular redondo y pequeño y procesos largos y delgados. (B) Microglia hipertrófica, con soma alargado y procesos cortos y gruesos. (C) Microglia ameboide, con soma celular grande y redondeado y con pocos o ningún proceso. (D) Regiones del hipocampo analizadas.
CA1: *Cornu Ammonis 1*; DG: *Dentate Gyrus*
Aumento: 1000X (A - C), 400X (D).

El ratio de la microglia activada fue mayor en los grupos de ratones con toxoplasmosis aguda y crónica (Figura 8) con respecto a aquellos de condición inmunosuprimida (Figura 9A), siendo la diferencia significativa solo entre el primero y el último ($p= 0,04$) (Tabla 4). En ningún grupo hubo diferencias significativas entre las dos regiones del hipocampo analizadas (CA1 y DG), aunque el ratio de microglia activada fue mayor en DG (Tabla 4). El número total de células inmunorreactivas a iba-1 fue similar en los tres grupos, siendo siempre mayores al número encontrado en los controles, que no presentaron microglia activada (Figura 9B).

Tabla 4. Ratio de microglia activada en ratones infectados

GRUPO	RATIO DE MICROGLIA ACTIVADA EN HIPOCAMPO		
	CA1	DG	TOTAL
Agudo (Grupo A)	0,63 ± 0,28	0,84 ± 0,15	0,74 ± 0,18*
Crónico (Grupo B)	0,49 ± 0,23	0,69 ± 0,18	0,60 ± 0,18
Inmunosuprimido (Grupo C)	0,26 ± 0,30	0,32 ± 0,29	0,29 ± 0,24

* Diferencia significativa en relación al grupo C ($p= 0,04$)

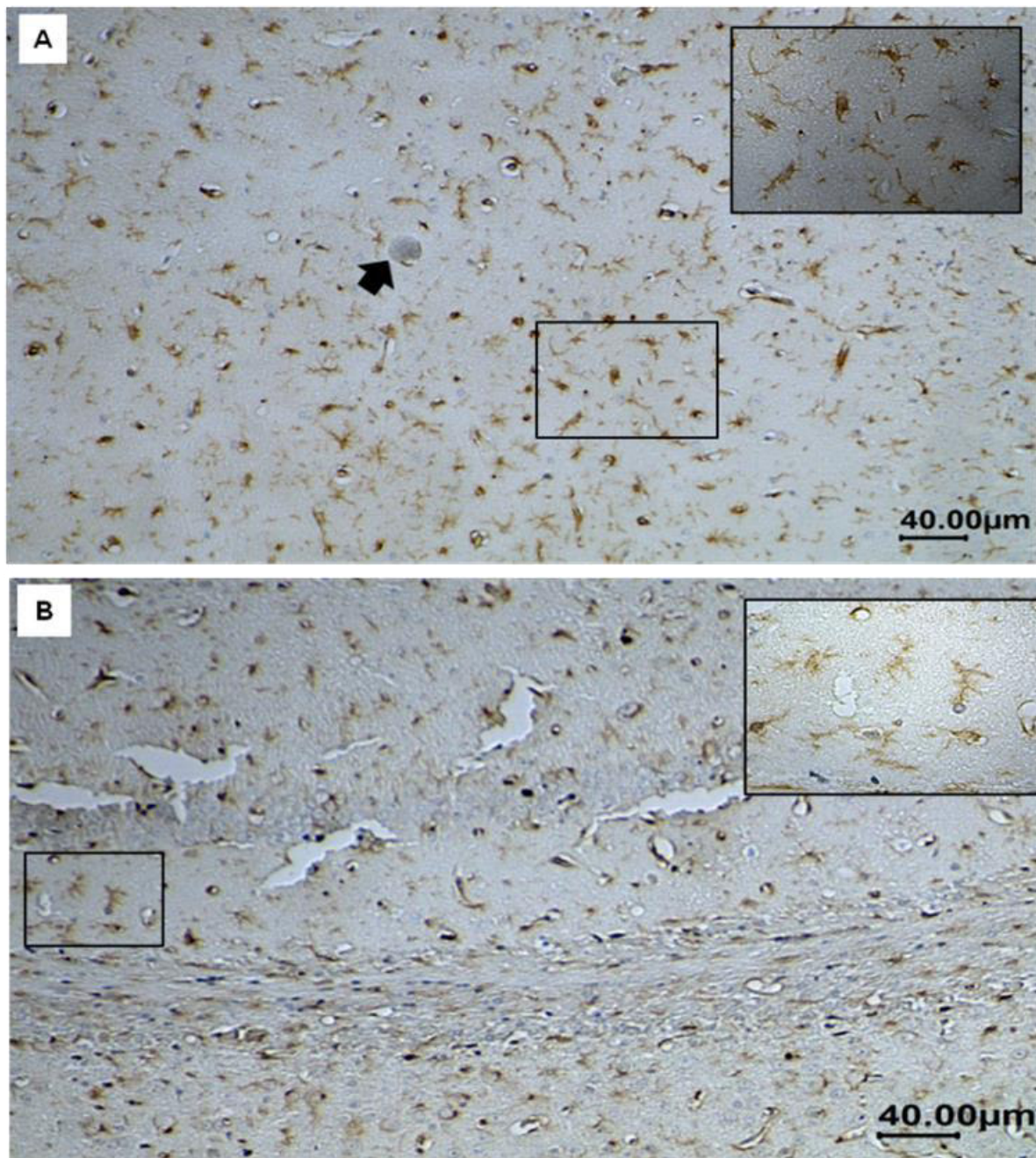


Figura 8. Pruebas de inmunohistoquímica para Iba-1 en ratones agudos y crónicos. Células inmunopositivas mostrando características morfológicas de activación (microglia hipertrófica) en un ratón agudo (A) y uno crónico (B). Las regiones seleccionadas se encuentran aumentadas en la parte superior derecha. La flecha negra gruesa señala un quiste de *T. gondii*. Aumento: 100X (A-B)

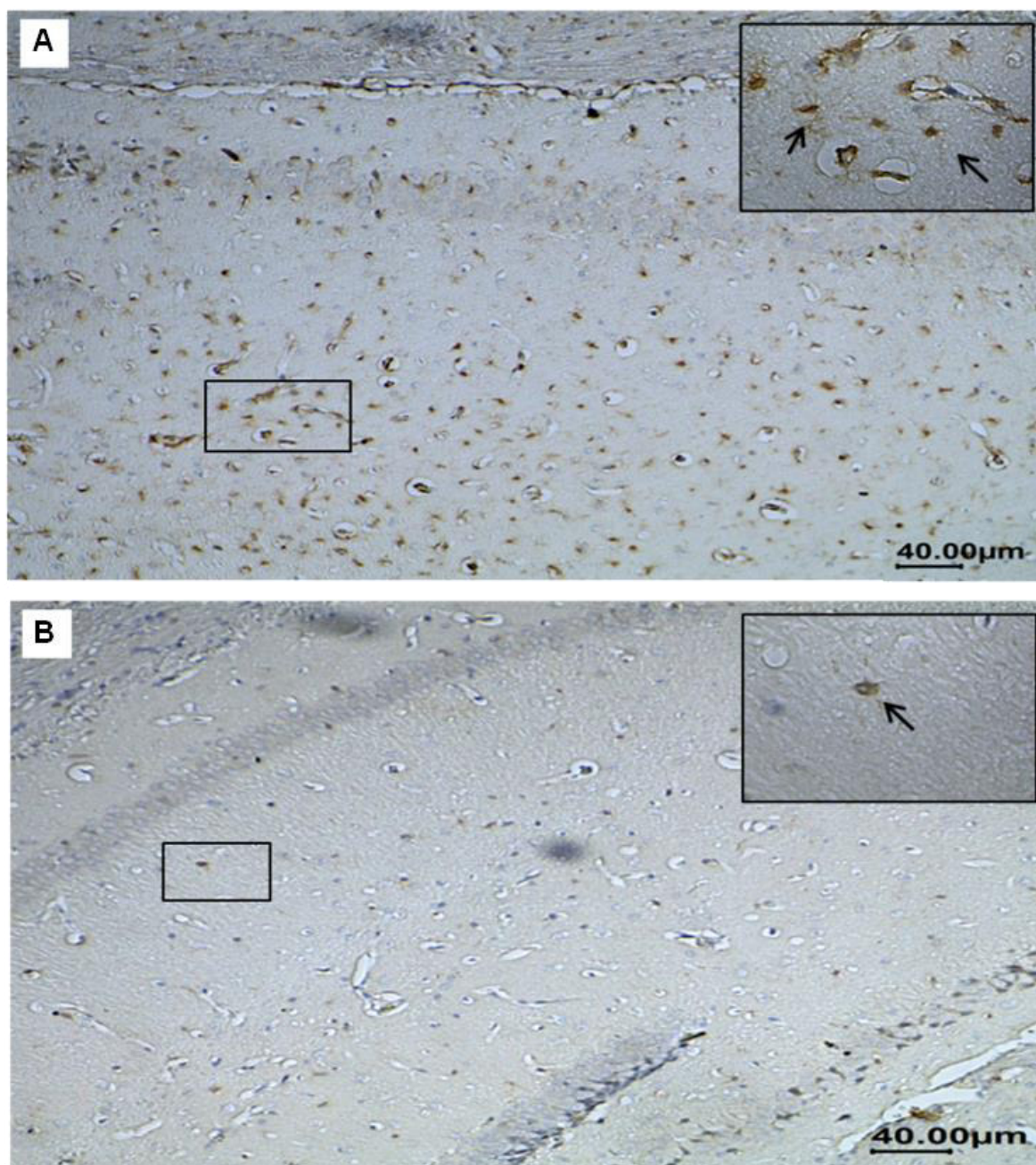


Figura 9. Pruebas de inmunohistoquímica para Iba-1 en ratones control y ratones inmunosuprimidos. Células inmunopositivas mostrando características morfológicas de reposo (microglia ramificada, flecha delgada) en un ratón inmunosuprimido (C) y un control (D). Las regiones seleccionadas se encuentran aumentadas en la parte superior derecha.
Aumento: 100X (A-B)

VII. DISCUSIÓN

7.1 La ciclofosfamida como agente inmunosupresor

En el presente trabajo se corroboró la eficacia del modelo de inmunosupresión al evaluar el efecto de la ciclofosfamida en el número total de leucocitos y en la producción de anticuerpos anti-*T. gondii*, observándose una reducción de los mismos en los ratones inmunosuprimidos. En cuanto al nivel de leucocitos, la ciclofosfamida indujo leucopenia, que es un efecto que se observa normalmente en modelos animales inmunosuprimidos con ciclofosfamida y también en humanos (Huyan *et al.*, 2011). El grado de severidad de la leucopenia está en relación a la dosis de ciclofosfamida y la vía y frecuencia de administración. Adicionalmente, Silva *et al.*, (2012) afirman que la leucopenia inducida por ciclofosfamida es el resultado de la reducción tanto del número de neutrófilos como el de linfocitos.

También es conocido el efecto nocivo de la ciclofosfamida en los linfocitos B (Ahmed y Hombal, 1984; Silva *et al.*, 2012), lo que explicaría la reducción de la producción de anticuerpos IgG e IgM anti-*T. gondii*. En el estudio de Kang *et al.*, (2006), se redujo el título de anticuerpos IgG, IgG2, IgA e IgM anti-*T. gondii* después de la inmunosupresión con dexametasona por cuatro semanas, con respecto a los ratones crónicos. Cabe señalar que el descenso del título de IgM se observó durante todo el tratamiento inmunosupresor; mientras que los niveles de IgG se incrementaron a partir de la tercera semana de inmunosupresión, aunque sus niveles nunca llegaron a ser iguales a los ratones crónicos. Resultados similares fueron reportados por Mose *et al.*, (2017) con la única diferencia de que el aumento de IgG anti-*T. gondii* se observó desde el día 6 post-inmunosupresión. Debido a que en el presente trabajo el tratamiento inmunosupresor tuvo una duración de seis días, solo se pudo observar la

reducción del nivel de ambos anticuerpos, lo que corresponde al efecto esperado por la ciclofosfamida.

Para el estudio de la infección de *T. gondii* en personas inmunosuprimidas se han usado una gran variedad de modelos, utilizando ratones con mutaciones que los hacen deficientes en la respuesta inmune (Johnson, 1992) o ratones *knockout*, en los que un gen específico, como el responsable de la producción de interferón alfa, está inactivado (Norose *et al.*, 2008). A pesar de su gran utilidad, estos modelos presentan dificultades en su obtención y/o mantenimiento, por lo que otros autores han optado por utilizar inmunosupresores para inducir la reactivación de la infección por *T. gondii* (Lüder *et al.*, 2014).

7.2 Carga parasitaria e histopatología de la infección por *T. gondii*

Los resultados obtenidos mostraron una mayor cantidad de quistes en el cerebelo de los ratones en fase aguda y en el cerebro de los ratones en fase crónica y en los inmunosuprimidos. En general, estos resultados están de acuerdo a lo registrado por otros autores, que afirman que el cerebelo presenta una baja concentración de parásitos (Hermes *et al.*, 2008; Berenreiterová *et al.*, 2011; Dellacasa-Lindberg *et al.*, 2011); incluso a pesar de que Haroon *et al.*, (2012) observaron que hay un aumento del número de quistes en el cerebelo desde los 30 a los 60 dpi, este número sigue estando muy por debajo del observado en otras regiones cerebrales. La razón por la cual *T. gondii* infecta en menor medida el cerebelo, podría ser por las características citológicas y morfológicas del cerebelo, que limitarían la proliferación de taquizoitos y la formación de quistes tisulares (Berenreiterová *et al.*, 2011).

Se resalta el estudio realizado por Verma y Bowlest (1967), quienes obtuvieron resultados similares al observar un aumento repentino del número de quistes en el cerebelo a los 19 dpi, mientras que en el presente estudio se obtuvo a los 18 dpi.

Debido a que la mayoría de estudios que analizan la distribución parasitaria en el SNC trabajan con modelos crónicos o reactivados, no es posible concluir si dicho aumento es un fenómeno que se dé frecuentemente, si es un aumento aleatorio o si está sujeto a determinados factores, como la cepa del parásito, de ratón o la vía de infección. Algunos trabajos han observado un cambio en el comportamiento de ratones con infección aguda por *T. gondii*, como la disminución de actividad exploratoria, la presencia de pelaje erizado o la disminución de comportamiento similar a la ansiedad (Sumyuen *et al.*, 1996; Gatkowska *et al.*, 2012). Debido a que el cerebelo tiene un rol importante en la coordinación de movimientos, el aumento de carga parasitaria en esta área podría estar involucrado en alguno de estos cambios de comportamiento; sin embargo, queda por determinar si existe dicha relación o si los cambios son un efecto secundario de la respuesta inmune a la infección aguda.

Asimismo, se observó una diferencia significativa en el número de quistes cerebrales entre los ratones agudos (18 días de infección) y los crónicos (120 días de infección), lo que está en concordancia con resultados de otros trabajos, que muestran que la aparición de quistes se inicia desde las dos semanas post-infección y que su número se incrementa conforme se establece la fase crónica (Kittas *et al.*, 1984; Ferguson *et al.*, 1991; Zenner *et al.*, 1999; Mose *et al.*, 2017). Respecto al daño patológico, en ambos casos se observaron lesiones inflamatorias leves, aunque la inflamación meníngea solo se observó en los ratones crónicos; esto concuerda con lo observado por Kittas *et al.*, (1984) y Ferguson *et al.*, (1991), que afirmaron que la severidad de las lesiones inflamatorias aumentaba con el tiempo de infección; aunque ellos evidenciaron inflamación meníngea durante de la etapa aguda (segunda y tercera semana de infección).

En cuanto a los ratones inmunosuprimidos, estos tuvieron una menor carga parasitaria que los crónicos, lo que contradice los resultados obtenidos por otros trabajos, que muestran lo contrario (Djurković-Djaković y Milenković, 2001; Kang *et al.*, 2006; Mose

et al., 2017). De la misma manera, la frecuencia de las lesiones inflamatorias (inflamación meníngea, perivascular y presencia de nódulos de inflamación parenquimales) también disminuyó en los ratones inmunosuprimidos, a pesar de que se ha reportado que presentan una mayor severidad en la infiltración celular (Nicoll *et al.*, 1997; Dellacasa-Lindberg *et al.*, 2007). Estos resultados, junto con la ausencia de focos parasitarios en el parénquima cerebral, indican que el proceso de reactivación no se habría podido evidenciar debido al protocolo de inmunosupresión utilizado. Es importante resaltar que en los diversos trabajos se presentan varias diferencias en cuanto al tipo de inmunosupresor y su vía de administración; a la dosis de inmunosupresión y al tiempo y la frecuencia del tratamiento.

En cuanto al inmunosupresor, se utilizó la ciclofosfamida ya que se ha corroborado su eficacia en la reactivación de la infección (Zhang *et al.*, 2014), no tiene un potencial efecto antiinflamatorio como la dexametasona y la cortisona acetato (Nicoll *et al.*, 1997; Djurković-Djaković y Milenković, 2001; Dellacasa-Lindberg *et al.*, 2007) y tampoco posee actividad inhibitoria *in vitro* contra *T. gondii* como la ciclosporina (Mack y McLeod, 1984; McCabe *et al.*, 1986). Para evitar la alta tasa de mortalidad de los ratones inmunosuprimidos que se ha evidenciado en estudios similares (Djurković-Djaković y Milenković, 2001; Kang *et al.*, 2006; Mose *et al.*, 2017), se administró una dosis mayor de ciclofosfamida (125 mg/Kg) en un periodo más corto de tiempo (diariamente por seis días) comparado a los estudios de Zhang *et al.*, (2014) (50 mg/Kg, diariamente por 15 días) y Silva *et al.*, (2012) (70 mg/Kg, semanalmente por 30 días) que también utilizaron ciclofosfamida como agente inmunosupresor. De esta manera, el tiempo de duración de la inmunosupresión podría haber sido un factor decisivo para evidenciar la reactivación de la infección, ya que en otros trabajos, como el de Dellacasa-Lindberg *et al.*, (2007) se observó focos de recrudescencia recién desde los 24 días de tratamiento inmunosupresivo con dexametasona. A pesar de esto, se debe tener en cuenta de que Silva *et al.*, (2012) también obtuvieron resultados

similares a pesar de que su tratamiento inmunosupresor fue más prolongado (una dosis semanal por 30 días, 70 mg/Kg de ciclofosfamida).

Tomando en cuenta los resultados de histopatología y la carga parasitaria, se puede afirmar que el esquema de inmunosupresión utilizado no fue eficaz en generar la reactivación de la infección crónica, siendo los puntos críticos la duración y el intervalo de las dosis aplicadas.

En cuanto a la distribución parasitaria en diversas regiones cerebrales, no se encontró diferencias en el número de quistes entre la corteza, el tálamo, el hipotálamo y el hipocampo, aunque la corteza tuvo una ligera mayor carga parasitaria. Estos resultados están en concordancia con varios trabajos que encontraron una mayor cantidad de quistes en el cerebro frontal, áreas corticales y/o telencéfalo (Verma y Bowlest, 1967; Dellacasa-Lindberg *et al.*, 2007; Berenreiterová *et al.*, 2011); sin embargo, también hay reportes que indican una mayor carga parasitaria en otras regiones como el diencefalo (Hermes *et al.*, 2008), una disminución de quistes en la corteza, o un aumento en la amígdala y el hipotálamo una vez establecida la etapa crónica (Gatkowska *et al.*, 2012; Haroon *et al.*, 2012).

A pesar de que en modelos animales se han observado constantemente cambios conductuales relacionados a la infección con *T. gondii*, todavía no se ha podido determinar con certeza si el parásito tiene tropismo hacia ciertas estructuras o regiones cerebrales relacionadas con alguna función específica, ya que los diferentes trabajos muestran gran diversidad de resultados, por lo que se infiere que la distribución parasitaria en el cerebro es aleatoria (Berenreiterová *et al.*, 2011) y que existirían otros mecanismos mediante los cuales *T. gondii* podría alterar la función cerebral normal (Parlog *et al.*, 2015).

7.3 Microglia activada en la patología de la toxoplasmosis cerebral

Los resultados obtenidos mostraron un mayor ratio de la microglia activada en los ratones agudos y crónicos, seguidos de los inmunosuprimidos. A pesar de que en la mayoría de ratones agudos no se observó quistes ni antígeno parasitario en el parénquima cerebral, la presencia de microglia activada confirma indirectamente el establecimiento de *T. gondii* en el cerebro; estos resultados coinciden con otros trabajos en los que se detecta un aumento en su número en la fase aguda de la toxoplasmosis cerebral (Wang y Suzuki, 2007; Hwang *et al.*, 2018). Por ser células involucradas en la vigilancia inmune del SNC, la microglia se activa ante la entrada de patógenos o algún trauma cerebral, y contribuye a la defensa por medio de la secreción de citoquinas, radicales libres y cumpliendo su rol de células presentadoras de antígeno en el cerebro (Rock *et al.*, 2004). Específicamente, en la infección aguda por *T. gondii*, la microglia activada limita la replicación de los taquizoitos a través de la producción de óxido nítrico (NO) y secreta quimiocinas para el reclutamiento de leucocitos al parénquima cerebral, además de ser una fuente no linfocitaria de IFN- γ (Rock *et al.*, 2004; Wang y Suzuki, 2007).

En los ratones crónicos también se observó un alto ratio de microglia activada, lo que concuerda con lo obtenido por Hwang *et al.*, (2018) que observaron la presencia continua de células inmunorreactivas a Iba-1 desde la tercera hasta la semana 12 post-infección. Se ha observado que una activación prolongada de la microglia produce daño cerebral debido a la continua producción de citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS), que producen estrés oxidativo y neurotoxicidad (Thameem Dheen *et al.*, 2007; Lull y Block, 2010). Estos mediadores inflamatorios también han sido relacionados con la aparición de síntomas psiquiátricos y de comportamiento agresivo, al tener un posible efecto modulador en la neurotransmisión (Del Grande *et al.*, 2017), lo que puede contribuir a la explicación de la presencia de alteraciones de comportamiento en personas seropositivas a *T. gondii*.

En ratones inmunosuprimidos, el ratio de microglia activada fue notoriamente mayor al de los controles negativos, similar a lo obtenido por Zhang *et al.*, (2014). Adicionalmente, algunos trabajos han señalado la importancia de la microglia y de citoquinas como el IFN- γ en la prevención de la reactivación de la infección, ya que su función contribuye al control de la replicación parasitaria (Gazzinelli *et al.*, 1993; Skariah *et al.*, 2010). Esto explicaría la razón por la cual los ratones inmunosuprimidos presentaron un ratio menor de microglia activada en comparación con los agudos y crónicos, sugiriendo que el descenso en su función efectora es un primer requisito para la reactivación y consiguiente proliferación parasitaria en individuos con inmunodeficiencias (Gazzinelli *et al.*, 1993; Mariani y Kielian, 2009).

VIII. CONCLUSIONES

- Se demuestra el efecto inmunosupresor de la ciclofosfamida, que altera la competencia inmunológica al producir leucopenia y disminuir la producción de anticuerpos.
- La carga parasitaria cerebral es dinámica, presentando variaciones de acuerdo al tiempo de infección y al estado inmunológico del hospedero.
- La activación de la microglia no varía frente a la carga parasitaria, pero sí frente al estado inmunológico del hospedero.

IX. RECOMENDACIONES

- Continuar los estudios de reactivación de la infección por *T. gondii* utilizando dosis de ciclofosfamida más altas y/o de mayor duración que las del presente trabajo, para comparar sus efectos en la carga parasitaria y patología cerebral.
- Realizar trabajos adicionales que tengan como objetivo estudiar el efecto de otras poblaciones celulares (astrocitos, linfocitos) en el desarrollo de la toxoplasmosis cerebral.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A.R. y HOMBAL, S.M., 1984. Cyclophosphamide (Cytoxan *) - A Review on Relevant Pharmacology and Clinical Uses. *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 11, no. 6, pp. 1115-1126.
- ALEXANDER, J., SCHARTON-KERSTEN, T.M., YAP, G., ROBERTS, C.W., LIEW, F.Y. y SHER, A., 1997. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 352, pp. 1355-1359.
- ANDRES, T.L., DORMAN, S.A., WINN JR., W., TRAINER, T.D. y PERL, D.P., 1981. Immunohistochemical demonstration of *Toxoplasma gondii*. *Am J Clin Pathol*, vol. 75, no. 3, pp. 431-434.
- BARRERA, D.E. y OPORTA, J.I., 2014. *Técnicas básicas y parámetros hematológicos aplicados en la realización del hemograma convencional*. S.l.: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- BERENREITEROVÁ, M., FLEGR, J., KUBĚNA, A.A. y NĚMEC, P., 2011. The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: Implications for the behavioral manipulation hypothesis. *PLOS ONE*, vol. 6, no. 12, pp. 1-14.
- BLANCHARD, N., DUNAY, I.R. y SCHLÜTER, D., 2015. Persistence of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system: A fine-tuned balance between the parasite, the brain and the immune system. *Parasite Immunology*, vol. 37, no. 3, pp. 150-158.

- CÁCEDA SÁNCHEZ, R., SEAS RAMOS, C., ECHEVARRÍA ZÁRATE, J., SAMALVIDES CUBA, F., LEÓN ROJAS, Y. y GOTUZZO HERENCIA, E., 2000. Toxoplasmosis cerebral en pacientes con SIDA en el Hospital Nacional Cayetano Heredia entre 1989 y 1999. *Revista Médica Herediana*, vol. 11, no. 1, pp. 15-21.
- CANTELLA, R., COLICHON, A., LOPEZ, L., WU, C., GOLDFARB, A., CUADRA, E., LATORRE, C., KANASHIRO, R., DELGADO, M. y PISCOYA, Z., 1974. Toxoplasmosis in Peru. Geographic prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in Peru studied by indirect fluorescent antibody technique. *Tropical and Geographical Medicine*, vol. 26, no. 2, pp. 204-209.
- CHAO, C.C., ANDERSON, . Robert, HU, S., GEKKER, G., MARTELLA, A. y PETERSON, P.K., 1993. Activated Microglia Inhibit Multiplication of *Toxoplasma gondii* via a Nitric Oxide Mechanism. *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 67, no. 2, pp. 178-183.
- CHIRCH, L.M. y LUFT, B.J., 2007. Cerebral toxoplasmosis in AIDS. En: P. PORTEGIES y J.. BERGER (eds.), *Handbook of Clinical Neurology*. S.l.: Elsevier, pp. 147-158. ISBN 9780444520104.
- CONLEY, F.K. y JENKINS, K.A., 1981a. Immunohistological study of the anatomic relationship of toxoplasma antigens to the inflammatory response in the brains of mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, vol. 31, no. 3, pp. 1184-1192.
- CONLEY, F.K., JENKINS, K.A. y REMINGTON, J.S., 1981b. *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate toxoplasma in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. *Human Pathology*, vol. 12, no. 8, pp. 690-698.

- DARDÉ, M.-L., AJZENBERG, D. y SU, C., 2014. Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii*. En: L.M. WEISS y K. KIM (eds.), *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. Segunda Ed. Gran Bretaña: s.n., pp. 61-98.
- DEL GRANDE, C., GALLI, L., DELL'OSSO, L., SCHIAVI, E. y BRUSCHI, F., 2017. Is *Toxoplasma gondii* a Trigger of Bipolar Disorder? *Pathogens*, vol. 6, no. 1, pp. 3.
- DELLACASA-LINDBERG, I., FUKS, J.M., ARRIGHI, R.B.G., LAMBERT, H., WALLIN, R.P.A., CHAMBERS, B.J. y BARRAGAN, A., 2011. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, vol. 79, no. 8, pp. 3046-3052.
- DELLACASA-LINDBERG, I., HITZIGER, N. y BARRAGAN, A., 2007. Localized recrudescence of *Toxoplasma* infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Microbes and Infection*, vol. 9, no. 11, pp. 1291-1298.
- DINCEL, G.C. y ATMACA, H.T., 2015. Nitric oxide production increases during *Toxoplasma gondii* encephalitis in mice. *Experimental Parasitology*, vol. 156, pp. 104-112.
- DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. y MILENKOVIĆ, V., 2001. Murine model of drug-induced reactivation of *Toxoplasma gondii*. *Acta Protozoologica*, vol. 40, no. 2, pp. 99-106.
- DUBEY, J.P., 2014. The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. En: L. WEISS y K. KIM (eds.), *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. Segunda Ed. S.I.: Elsevier Academic Press, pp. 1-18.

- DUBEY, J.P., APPLEWHAITE, L., SUNDAR, N., VELMURUGAN, G. V., BANDINI, L.A., KWOK, O.C.H., HILL, R. y SU, C., 2007. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitology*, vol. 134, no. 11, pp. 1559-1565.
- DUBEY, J.P., VIANNA, M.C.B., SOUSA, S., CANADA, N., MEIRELES, S., CORREIA DA COSTA, J.M., MARCET, P.L., LEHMANN, T., DARDÉ, M.L. y THULLIEZ, P., 2006a. Characterization of *Toxoplasma Gondii* Isolates in Free- Range Chickens From Portugal. *Journal of Parasitology*, vol. 92, no. 1, pp. 184-186.
- DUBEY, J.P., SU, C., OLIVEIRA, J., MORALES, J.A., BOLAÑOS, R. V., SUNDAR, N., KWOK, O.C.H. y SHEN, S.K., 2006b. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Costa Rica, Central America. *Veterinary Parasitology*, vol. 139, pp. 29-36.
- DUBEY, J.P., PATITUCCI, A.N., SU, C., SUNDAR, N., KWOK, O.C.H. y SHEN, S.K., 2006c. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. *Veterinary Parasitology*, vol. 140, no. 1-2, pp. 76-82.
- DUBEY, J.P., EDELHOFER, R., MARCET, P., VIANNA, M.C.B., KWOK, O.C.H. y LEHMANN, T., 2005a. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. *Veterinary Parasitology*, vol. 133, pp. 299-306.
- DUBEY, J.P., GOMEZ-MARIN, J.E., BEDOYA, A., LORA, F., VIANNA, M.C.B., HILL, D., KWOK, O.C.H., SHEN, S.K., MARCET, P.L. y LEHMANN, T., 2005b. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. *Veterinary Parasitology*, vol. 134, no. 1-2, pp. 67-72.

- DUBEY, J.P., LOPEZ, B., ALVAREZ, M., MENDOZA, C. y LEHMANN, T., 2005c. Isolation, Tissue Distribution, and Molecular Characterization of *Toxoplasma gondii* From Free-Range Chickens From Guatemala. *Journal of Parasitology*, vol. 91, no. 4, pp. 955-957.
- DUBEY, J.P., LEVY, M.Z., SREEKUMAR, C., KWOK, O.C.H., SHEN, S.K., DAHL, E., THULLIEZ, P. y LEHMANN, T., 2004. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *The Journal of parasitology*, vol. 90, no. 5, pp. 1015-1018.
- DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DAHL, E., SREEKUMAR, C., LEHMANN, T., DAVIS, M.F. y MORISHITA, T.Y., 2003a. *Toxoplasma gondii* Isolates from Free-Ranging Chickens From the United States. *Journal of Parasitology*, vol. 89, no. 5, pp. 1060-1062.
- DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DA SILVA, D.S., LEHMANN, T. y BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G., 2003b. *Toxoplasma gondii* Isolates of Free-Ranging Chickens From Rio de Janeiro, Brazil: Mouse Mortality, Genotype, and Oocyst Shedding by Cats. *Journal of Parasitology*, vol. 89, no. 4, pp. 851-853.
- DUBEY, J.P., VENTURINI, M.C., VENTURINI, L., PISCOPO, M., GRAHAM, D.H., DAHL, E., SREEKUMAR, C., VIANNA, M.C. y LEHMANN, T., 2003c. Isolation and Genotyping of *Toxoplasma gondii* From Free-Ranging Chickens From Argentina. *Journal of Parasitology*, vol. 89, no. 5, pp. 1063-1064.
- ELSHEIKHA, H.M. y KHAN, N.A., 2010. Protozoa traversal of the blood-brain barrier to invade the central nervous system. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 34, no. 4, pp. 532-553.

- EZA, D., CERRILLO, G., CASTRO, C., TICONA, E., MORALES, D., HERRERA, P.M., ALFARO, A., CABANILLAS, J., BARRANTES, F., BENAVIDES, A., RAFAEL, A., VALLADARES, G., FERNANDO ARÉVALO, F., MOORE, D.A.J., EVANS, C.A. y GILMAN, R.H., 2006. Resultados postmórtem e infecciones oportunistas en pacientes VIH positivos de un hospital público del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, vol. 23, no. 4, pp. 270-274.
- FERGUSON, D.J., GRAHAM, D.I. y HUTCHISON, W.M., 1991. Pathological changes in the brains of mice infected with *Toxoplasma gondii*: a histological, immunocytochemical and ultrastructural study. *International journal of experimental pathology*, vol. 72, no. 4, pp. 463-74.
- FERREIRA, M.S. y BORGES, A.S., 2002. Some Aspects of Protozoan Infections in Immunocompromised Patients -A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, vol. 97, no. 4, pp. 443-457.
- FLEGR, J., 2013. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends in Parasitology*, vol. 29, no. 4, pp. 156-163.
- FOROUTAN-RAD, M., MAJIDIANI, H., DALVAND, S., DARYANI, A., KOOTI, W., SAKI, J., HEDAYATI-RAD, F. y AHMADPOUR, E., 2016. Toxoplasmosis in Blood Donors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfusion Medicine Reviews*, vol. 30, no. 3, pp. 116-122.
- GALVÁN-RAMIREZ, M.L., MADRIZ ELISONDO, A.L., RICO TORRES, C.P., LUNA-PASTÉN, H., RODRIGUEZ PÉREZ, L.R., RINCÓN-SÁNCHEZ, A.R., FRANCO, R., SALAZAR-MONTES, A. y CORREA, D., 2010. Frequency of *Toxoplasma gondii* in Pork Meat in Ocotlán, Jalisco, Mexico. *Journal of Food Protection*, vol. 73, no. 6, pp. 1121-1123.

- GARCÍA, M., CHÁVEZ, A., CASAS, E., DÍAZ, D., AVEDAÑO, J., CAMPOS, B. y LOAYZA, F., 2002. Estudio de las Zoonosis parasitarias de localización ocular en el Instituto de Oftalmología (INO) (Periodo 1985-1999). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, vol. 13, no. 2, pp. 78-83.
- GATKOWSKA, J., WIECZOREK, M., DZIADEK, B., DZITKO, K. y DLUGONSKA, H., 2012. Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. *Parasitology Research*, vol. 111, pp. 53-58.
- GAZZINELLI, R.T., ELTOUM, I., WYNN, T.A. y SHER, A., 1993. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *The Journal of Immunology*, vol. 151, pp. 3672-3681.
- GULINELLO, M., ACQUARONE, M., KIM, J.H., SPRAY, D.C., BARBOSA, H.S., SELLERS, R., TANOWITZ, H.B. y WEISS, L.M., 2010. Acquired infection with *Toxoplasma gondii* in adult mice results in sensorimotor deficits but normal cognitive behavior despite widespread brain pathology. *Microbes and Infection*, vol. 12, no. 7, pp. 528-537.
- GUTIERREZ LOLI, R.M., 2016. *Caracterización funcional del péptido beta -amiloide en neurocisticercosis porcina*. S.I.: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- HALONEN, S.K. y WEISS, L.M., 2013. Toxoplasmosis. En: H.H. GARCIA, H.B. TANOWITZ y O.H. DEL BRUTTO (eds.), *Handbook of Clinical Neurology*. pp. 125-145.

- HAROON, F., HÄNDEL, U., ANGENSTEIN, F., GOLDSCHMIDT, J., KREUTZMANN, P., LISON, H., FISCHER, K.D., SCHEICH, H., WETZEL, W., SCHLÜTER, D. y BUDINGER, E., 2012. *Toxoplasma gondii* actively inhibits neuronal function in chronically infected mice. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4.
- HENRIQUEZ, S.A., BRETT, R., ALEXANDER, J., PRATT, J. y ROBERTS, C.W., 2009. Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. *NeuroImmunoModulation*, vol. 16, no. 2, pp. 122-133.
- HERMES, G., AJIOKA, J.W., KELLY, K. a, MUI, E., ROBERTS, F., KASZA, K., MAYR, T., KIRISITS, M.J., WOLLMANN, R., FERGUSON, D.J.P., ROBERTS, C.W., HWANG, J.-H., TRENDLER, T., KENNAN, R.P., SUZUKI, Y., REARDON, C., HICKEY, W.F., CHEN, L. y MCLEOD, R., 2008. Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection. *Journal of neuroinflammation*, vol. 5, pp. 48.
- HILL, D.E., CHIRUKANDOTH, S. y DUBEY, J.P., 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*, vol. 6, no. 1, pp. 41-61.
- HO-YEN, D.O., 2001. Infection in the immunocompetent. En: D.H.M. JOYNSON y T.G. WREGHITT (eds.), *Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide*. S.l.: Cambridge University Press, pp. 125-146.
- HOWE, D.K. y SIBLEY, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages : Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, no. 172, pp. 1561-1566.

- HUYAN, X., LIN, Y., GAO, T., CHEN, R. y FAN, Y., 2011. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *International Immunopharmacology*, vol. 11, pp. 1293-1297.
- HWANG, Y.S., SHIN, J.-H., YANG, J.-P., JUNG, B.-K., LEE, S.H. y SHIN, E.-H., 2018. Characteristics of infection immunity regulated by *Toxoplasma gondii* to maintain chronic infection in the brain. *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. 158, pp. 1-18.
- JOHNSON, L.L., 1992. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infection and Immunity*, vol. 60, no. 9, pp. 3719-3724.
- KAMERKAR, S. y DAVIS, P.H., 2012. *Toxoplasma* on the brain: Understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection. *Journal of Parasitology Research*, vol. 2012.
- KANG, H. y SUZUKI, Y., 2001. Requirement of Non-T Cells That Produce Gamma Interferon for Prevention of Reactivation of *Toxoplasma gondii* Infection in the Brain. *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 5, pp. 2920-2927.
- KANG, K.N., CHOI, I.U., SHIN, D.W. y LEE, Y.H., 2006. Cytokine and antibody responses of reactivated murine toxoplasmosis upon administration of dexamethasone. *The Korean journal of parasitology*, vol. 44, no. 3, pp. 209-219.
- KHAN, A., FUX, B., SU, C., DUBEY, J.P., DARDE, M.L., AJIOKA, J.W., ROSENTHAL, B.M. y SIBLEY, L.D., 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 37, pp. 14872-14877.

- KITTAS, S., KITTAS, C., PAIZI-BIZA, P. y HENRY, L., 1984. A histological and immunohistochemical study of the changes induced in the brains of white mice by infection with *Toxoplasma gondii*. *British journal of experimental pathology*, vol. 65, no. 1, pp. 67-74.
- LACUNZA-PAREDES, R. y BOZA-MARROQUÍN, M., 2012. Hidropesía fetal como signo ecográfico de toxoplasmosis congénita. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, vol. 58, pp. 55-58.
- LENGUA-YONZ, P.A., CUADROS-MARTÍNEZ, J.E., SIVERIO-LLOSA, C., A., C.-R. y MUNAYCO-GUILLÉN, F., 2013. Epidemiología de la Toxoplasmosis ocular en pacientes del Instituto Nacional de Oftalmología del Perú, 2003-2007. *Revista Médica Panacea*, vol. 3, no. 3, pp. 68-71.
- LÜDER, C.G.K. y RAHMAN, T., 2017. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. *Microbial Cell*, vol. 4, no. 7, pp. 203-211.
- LÜDER, C.G.K., REICHARD, U. y GROSS, U., 2014. *Toxoplasma* animal models and therapeutics. En: L.M. WEISS y K. KIM (eds.), *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. Segunda Ed. S.I.: Elsevier Academic Press, pp. 217-255.
- LULL, M.E. y BLOCK, M.L., 2010. Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration. *Neurotherapeutics*, vol. 7, no. 4, pp. 354-365.
- MACK, D.G. y MCLEOD, R., 1984. New Micromethod to Study the Effect of Antimicrobial Agents on *Toxoplasma gondii*: Comparison of Sulfadoxine and Sulfadiazine Individually and in Combination with Pyrimethamine and Study of Clindamycin, Metronidazole and Cyclosporin A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 26, no. 1, pp. 26-30.

- MAGUIÑA, C., GOTUZZO, E., ALVAREZ, H., CARCELÉN, A., IRRIVAREN, J., SOTO, J. y COK, J., 1998. Toxoplasmosis en Bartonellosis humana. *Revista Médica Herediana*, vol. 9, no. 3, pp. 14-20.
- MARIANI, M.M. y KIELIAN, T., 2009. Microglia in infectious diseases of the Central Nervous System. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, vol. 4, no. 4, pp. 448-461.
- MCCABE, R.E., LUFT, B.J. y REMINGTON, J.S., 1986. The effects of cyclosporine on *Toxoplasma gondii* in vivo and in vitro. *Transplantation*, vol. 41, no. 5, pp. 611-615.
- MCFARLAND, M.M., BARTLETT, M.L. y DAVIS, P.H., 2016. Toxoplasmic Encephalitis. En: AVID SCIENCE (ed.), *Encephalitis*. 1st. S.l.: Avid Science, pp. 2-52. ISBN 4025543532.
- MCLEOD, R., VAN TUBBERGEN, C., MONTOYA, J.G. y PETERSEN, E., 2014. Human *Toxoplasma* Infection. En: L.M. WEISS y K. KIM (eds.), *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. Segunda Ed. S.l.: Elsevier Academic Press, pp. 99-159.
- MONTOYA, J.G., 2002. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of infectious diseases*, vol. 185 Suppl, pp. S73-S82.
- MORALES AYALA, F., GIL HENRÍQUEZ, A., VILLANUEVA MONTOYA, V. y GÓMEZ ESTRADA, F., 1979. Prevalencia de infección por *Toxoplasma* en escolares. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, vol. 86, no. 4, pp. 306-310.
- MOSE, J.M., MUCHINA KAMAU, D., KAGIRA, J.M., MAINA, N., NGOTHO, M., NJUGUNA, A. y KARANJA, S.M., 2017. Development of Neurological Mouse Model for Toxoplasmosis Using *Toxoplasma gondii* Isolated from Chicken in Kenya. *Pathology Research International*, vol. 2017.

- NICOLL, S., WRIGHT, S., MALEY, S.W., BURNS, S. y BUXTON, D., 1997. A mouse model of recrudescence of *Toxoplasma gondii* infection. *J.Med.Microbiol.*, vol. 46, no. 1997, pp. 263-266.
- NOROSE, K., NAOI, K., FANG, H. y YANO, A., 2008. In vivo study of toxoplasmic parasitemia using interferon- γ -deficient mice: Absolute cell number of leukocytes, parasite load and cell susceptibility. *Parasitology International*, vol. 57, no. 4, pp. 447-453.
- NUNURA, J., VÁSQUEZ, T., ENDO, S., SALAZAR, D., RODRIGUEZ, A., PEREYRA, S. y SOLIS, H., 2010. Disseminated toxoplasmosis in an immunocompetent patient from Peruvian Amazon. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 52, no. 2, pp. 107-110.
- PARLOG, A., SCHLÜTER, D. y DUNAY, I.R., 2015. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. *Parasite Immunology*, vol. 37, no. 3, pp. 159-170.
- PENA, H.F.J., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P. y SU, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*, vol. 38, pp. 561-569.
- PRANDOVSKY, E., GASKELL, E., MARTIN, H., DUBEY, J.P., WEBSTER, J.P. y MCCONKEY, G.A., 2011. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. *PLoS ONE*, vol. 6, no. 9.
- RAJENDRAN, C., SU, C. y DUBEY, J.P., 2012. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 12, no. 2, pp. 359-368.

- REÁTEGUI, C. y VELA, L., 2011. Factores socioeconómicos-epidemiológicos y su relación con la seroprevalencia de toxoplasmosis en gestantes atendidas en los hospitales «Felipe Arriola» y «César Garayar», Iquitos, Perú, 2009. *Neotropical Helminthology*, vol. 5, no. 1, pp. 31-40.
- ROBERT-GANGNEUX, F. y DARDÉ, M.L., 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, no. 2, pp. 264-296.
- ROCK, R.B., GEKKER, G., HU, S., SHENG, W.S., CHEERAN, M., LOKENSGARD, J.R. y PETERSON, P.K., 2004. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, no. 4, pp. 942-64.
- SAMALVIDES, S.K., MILLA, L.M., VILA, J.R., ESPINOZA, I. y GUILLÉN, D., 2014. Tres formas clínico-radiológicas de compromiso neurológico por toxoplasmosis congénita. *Revista de Neuropsiquiatria*, vol. 77, no. 3, pp. 188-195.
- SCHARTON-KERSTEN, T.M., YAP, G., MAGRAM, J. y SHER, A., 1997. Inducible Nitric Oxide Is Essential for Host Control of Persistent but Not Acute Infection with the Intracellular Pathogen *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 185, no. 7, pp. 1261-1273.
- SEPÚLVEDA-ARIAS, J.C., GÓMEZ-MARIN, J.E., BOBIĆ, B., NARANJO-GALVIS, C.A. y DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O., 2014. Toxoplasmosis as a travel risk. *Travel Medicine and Infectious Disease*, vol. 12, no. 6, pp. 592-601.
- SIBLEY, L.D., KHAN, A., AJIOKA, J.W. y ROSENTHAL, B.M., 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 364, no. 1530, pp. 2749-2761.

- SILVA, A.F., OLIVEIRA, F.C.R., LEITE, J.S., MELLO, M.F. V, BRANDÃO, F.Z., LEITE, R.I.J.C.K., FRAZÃO-TEIXEIRA, E., LILENBAUM, W., FONSECA, A.B.M. y FERREIRA, A.M.R., 2013. Immunohistochemical identification of *Toxoplasma gondii* in tissues from Modified Agglutination Test positive sheep. *Veterinary Parasitology*, vol. 191, no. 3-4, pp. 347-352.
- SILVA, L.A., BRANDÃO, G.P., PINHEIRO, B. V. y VITOR, R.W.A., 2012. Immunosuppression with cyclophosphamide favors reinfection with recombinant *Toxoplasma gondii* strains. *Parasite*, vol. 19, pp. 249-57.
- SKARIAH, S., MCINTYRE, M.K. y MORDUE, D.G., 2010. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitology research*, vol. 107, no. 2, pp. 253-260.
- SU, C., KHAN, A., ZHOU, P., MAJUMDAR, D., AJZENBERG, D., DARDE, M.-L., ZHU, X.-Q., AJIOKA, J.W., ROSENTHAL, B.M., DUBEY, J.P. y SIBLEY, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 15, pp. 5844-5849.
- SUMYUEN, M.H., GARIN, Y.J.F. y DEROUIN, F., 1996. Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis. *Parasitology Research*, vol. 82, no. 8, pp. 681-686.
- SZABO, E.K. y FINNEY, C.A.M., 2017. *Toxoplasma gondii*: One Organism, Multiple Models. *Trends in Parasitology*, vol. 33, no. 2, pp. 113-127.
- TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R. y WEISS, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International Journal for Parasitology*, vol. 30, pp. 1217-1258.

- THAMEEM DHEEN, S., KAUR, C. y LING, E.-A., 2007. Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 11, pp. 1189-1197.
- VERMA, M.P. y BOWLEST, L., 1967. Concentration of *Toxoplasma gondii* in the Brain Tissue of Animals : A Histological Study Confirmed by Biological Isolations. *The Journal of parasitology*, vol. 53, no. 2, pp. 254-257.
- WANG, X. y SUZUKI, Y., 2007. Microglia Produce IFN- γ Independently from T Cells During Acute Toxoplasmosis in the Brain. *Journal of Interferon and Cytokine research*, vol. 27, pp. 599-605.
- WANG, Z.D., WANG, S.C., LIU, H.H., MA, H.Y., LI, Z.Y., WEI, F., ZHU, X.Q. y LIU, Q., 2017. Prevalence and burden of *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected people: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet HIV*, vol. 4, pp. e177-e188.
- WAREE, P., FERGUSON, D.J.P., PONGPONRATN, E. y CHAISRI, U., 2007. Immunohistochemical study of acute and chronic toxoplasmosis in experimentally infected mice. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, vol. 38, no. 2, pp. 223-231.
- WEISS, L.M. y DUBEY, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, vol. 39, no. 8, pp. 895-901.
- WONG, S.-Y. y REMINGTON, J.S., 1993. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS*, no. 7, pp. 299-316.
- YOLKEN, R.H., DICKERSON, F.B. y FULLER TORREY, E., 2009. *Toxoplasma* and schizophrenia. *Parasite Immunology*, vol. 31, no. 11, pp. 706-715.

YOLKEN, R.H. y TORREY, E.F., 2008. Are some cases of psychosis caused by microbial agents? A review of the evidence. *Molecular Psychiatry*, vol. 13, no. 5, pp. 470-479.

ZENNER, L., FOULET, a, CAUDRELIER, Y., DARCY, F., GOSSELIN, B., CAPRON, a y CESBRON-DELAUW, M.F., 1999. Infection with *Toxoplasma gondii* RH and Prugniaud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. *Pathology, research and practice*, vol. 195, no. 7, pp. 475-485.

ZHANG, Y.-H., CHEN, H., CHEN, Y., WANG, L., CAI, Y.-H., LI, M., WEN, H.-Q., DU, J., AN, R., LUO, Q.-L., WANG, X.-L., LUN, Z.-R., XU, Y.-H. y SHEN, J.-L., 2014. Activated microglia contribute to neuronal apoptosis in Toxoplasmic encephalitis. *Parasites & vectors*, vol. 7, no. 1, pp. 372.

XI. ANEXOS

Reactivo de Turk

- Ácido acético glacial 2 mL
- Violeta de genciana al 1% 1 mL
- Agua destilada 100 mL

SOLUCIONES PARA ELISA

Amortiguador de carbonatos 0.015 M, pH 9.6

- Na_2CO_3 1.59 g
- NaHCO_3 1.26 g
- Agua destilada 800 mL

Ajustar pH a 9.6, aforar a 1000 mL y mantener a 4°C

PBS 1X

Solución PB 10X:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.62 g
- Na_2HPO_4 11.5 g
- Agua destilada 1000 mL

Solución de trabajo 1X:

- Solución PB 10X 100 mL
- NaCl 8.75 g
- Agua destilada 800 mL

Disolver, ajustar a pH 7.2, aforar a 1000 mL y mantener a 4°C

Amortiguador de lavado (PBS-Tween 20, 0.05%)

- PBS pH 7.2 1 L
- Tween 20 500 µL

Mantener a 4°C

Solución de bloqueo (Leche descremada al 5%)

- Leche descremada en polvo 5 g
- PBS-Tween 0.05% 100 ml

Guardar a -20°C

Solución de cromógeno /sustrato

- Ácido cítrico 0.1 M 5 mL
- Citrato de sodio 0.1 M 5 mL
- Peróxido de hidrógeno 30% 4 µL
- O-fenilendiamina 4 mg

Preparar inmediatamente antes de su uso. Mantener en oscuridad.

Solución de ácido sulfúrico 2N

- H₂SO₄ concentrado 98.08 mL
- Agua destilada 1 L
-

SOLUCIONES PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Buffer citrato de sodio

- Citrato de trisodio dihidratado 2.94 g
- Agua destilada 1000 ml

Ajustar a pH 6 y agregar 0.5 ml de Tween 20. Mezclar bien.

PBS 1X

- NaCl 8 g
- KCl 0.2 g
- Na₂HPO₄ 1.419 g
- KH₂PO₄ 0.27 g

Enrasar a 1L de H₂O MiliQ y llevar a pH 7

PBS-Tween al 0.05%

- PBS 1X 1000 ml
- Tween 20 0.5 ml

Mezclar bien. Llevar a pH 7.2 con HCl 1N

Solución mixta

- PBS-Tween al 0.05% 100 ml
- Tritón 100x 100 µl

Mantener a 4°C

Solución de bloqueo

- Solución mixta 1500 µl
- Leche descremada (4%) 60 mg

Mezclar fuertemente. Eliminar grumos antes de aplicar NGS.

- Normal Goat Serum (NGS) (2%) 30 µl

Solución de bloqueo de la peroxidasa endógena

- Peróxido de hidrógeno 30% 300 µl
- PBS 1X 1200 µl

Evitar exposición a la luz

Solución anticuerpo secundario

- Solución mixta 1000 µl
- Leche descremada 40 mg
- Anticuerpo secundario (1/100) 10 µl